
MASTERARBEIT

Frau B. Sc.
Tina Giersch

Etablierung einer Transkriptomanalytik für die Biogasfermentation

Mittweida, 2013

MASTERARBEIT

Etablierung einer Transkriptomanalytik für die Biogasfermentation

Autor:

Frau B. Sc.

Tina Giersch

Studiengang:

Molekularbiologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

MO11w1-M

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

Einreichung:

Mittweida, 08.12.2013

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 16.12.2013

Bibliographische Beschreibung:

Giersch, Tina: Etablierung einer Transkriptomanalytik für die Biogasfermentation. - 2013. – 7, 81, 9, S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Masterarbeit, 2013

Englischer Titel

Establishing Transcriptome Analytics for Biogas Fermentation

Kurzbeschreibung:

In der Arbeit geht es darum eine RT-PCR-Methodik für die 16S rRNA von *Escherichia coli* und die mcrA-RNA einer Biogasprobe sowie deren anschließende Vervielfältigung mittels Standard-PCR bzw. qPCR zu etablieren.

Teile der vorliegenden Masterarbeit wurden in folgendem Fachbeitrag (Anhang 2) veröffentlicht:

Stark, L.; Giersch, T.; Wünschiers, R. (2013): *Efficiency of RNA extraction from selected bacteria in the context of biogas production and metatranscriptomics.*

Anaerobe (accepted & in press)

doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.09.007

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei der gesamten Fachgruppe Biotechnologie der Hochschule Mittweida für das gute Arbeitsklima und die großartige Unterstützung während dieses Masterprojektes bedanken. Alle standen mir bei Fragen stets unterstützend zur Seite. Insbesondere danke ich meinen Betreuern Lucy Stark, Rösbe Wünschiers und Petra Radehaus sowie den Mitarbeitern Sandra Feik und René Kretschmer. Sie standen mir bei der Durchführung aller Versuche für die Masterarbeit besonders helfend zur Seite.

Weiterhin möchte ich all meinen Kommilitonen für die schöne Zeit während des Masterstudiums danken. Besonderer Dank gilt hier Gabriel Kind, der zeitgleich seine Masterthesis an der Hochschule Mittweida in der Fachgruppe Biotechnologie absolvierte und mir während dieser Zeit vor allem bei informatischen Fragen stets helfend zur Seite stand.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern Steffen und Claudia Jahn, meinen Großeltern sowie bei meinem Freund Andreas Hayn. Alle haben mich während meiner gesamten Studienzeit nicht nur teilweise finanziell, sondern stets auch moralisch unterstützt.

Abschließend gilt mein Dank auch der Agrargenossenschaft Hainichen-Pappendorf für die Bereitstellung der für meine Arbeit benötigten Fermenterproben einer Biogasanlage.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung & Zielstellung	1
2 Grundlagen.....	2
2.1 Die Biogasanlage	2
2.1.1 Die Entstehung von Biogas.....	2
2.1.2 Prozessstörungen und derzeitige Überwachungsmöglichkeiten einer Biogasanlage	3
2.2 Die RNA	5
2.2.1 Aufbau der RNA und Unterschiede zur DNA	5
2.2.2 RNA-Synthese durch Transkription in Prokaryoten.....	6
2.2.3 Das Metatranskriptom.....	9
2.2.4 Das Arbeiten mit RNA	10
2.3 Die 16S rRNA und die Methyl Coenzym M Reduktase A (mcrA)	10
2.3.1 Die 16S rRNA.....	10
2.3.2 Die Methyl Coenzym M Reduktase A (mcrA).....	11
2.4 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	12
2.4.1 Die Standard-PCR.....	12
2.4.2 Die Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	14
2.4.3 Die real-time quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	15
3 Material.....	20
3.1 Chemikalien	20
3.2 Nährmedien.....	21
3.3 Mikroorganismen.....	22
3.4 Molekularbiologische Reagenzien.....	22
3.5 Material	23
3.6 Geräte	25
4 Methoden	26
4.1 Herstellen der Reagenzien und Präparieren der Geräte	26

4.2 Versuch 1: verschiedene Methoden der RNA-Extraktion aus <i>Escherichia coli</i> ...	26
4.2.1 Zellwachstum und Zellernte	26
4.2.2 Zelllyse.....	26
4.2.3 Abtrennung der Proteine	27
4.2.4 Ausfällung der gesamten Nukleinsäuren	28
4.2.5 Entfernen der DNA	28
4.2.6 Überprüfen der RNA-Quantität und -Qualität	29
4.3 Implementierung einer RT-PCR und PCR für die 16S rRNA von <i>E. coli</i>	30
4.3.1 verwendete Primer und deren Analyse	30
4.3.2 Versuch 2: RT-PCR mit genspezifischen Primern	30
4.3.3 Versuch 3: RT-PCR mit Random Primern	34
4.3.4 Versuch 4: Einsatz einer größeren RNA-Menge in der RT-PCR	35
4.3.5 Versuch 5: Veränderung des Denaturierungsschrittes in der RT-PCR.....	39
4.3.6 Versuch 6: Restriktionsverdau	40
4.4 RNA-Extraktion aus einer Biogasprobe	42
4.5 Implementierung einer RT-PCR und qPCR für die mcrA-RNA aus einer Biogasprobe	44
4.5.1 verwendete Primer	44
4.5.2 Versuch 8: Amplifizieren der mcrA-RNA mittels qPCR	44
4.5.3 Versuch 9: Optimierung der qPCR-Reaktion	46
4.5.4 Versuch 10: Erstellen einer Standardkurve	47
4.5.5 Versuch 11: Überprüfung der mcrA-Konzentration in unterschiedlich gelagerten Biogasproben.....	48
5 Ergebnisse & Diskussion	50
5.1 Versuch 1: verschiedene Methoden der RNA-Extraktion aus <i>Escherichia coli</i> ...	50
5.2 Implementierung einer RT-PCR und PCR für die 16S rRNA von <i>E. coli</i>	53
5.2.1 Analyse der Primer UniBac und Univ	53
5.2.2 Versuch 2: RT-PCR mit genspezifischen Primern	54
5.2.3 Versuch 3: RT-PCR mit Random Primern	56
5.2.4 Versuch 4: Einsatz einer größeren RNA-Menge in der RT-PCR	57
5.2.5 Versuch 5: Veränderung des Denaturierungsschrittes in der RT-PCR.....	60
5.2.6 Versuch 6: Restriktionsverdau	62

5.3 Versuch 7: RNA-Extraktion aus einer Biogasprobe mit den Methoden GTC, EP, MP, TRI und BB	65
5.4 Implementierung einer RT-PCR und qPCR für die mcrA-RNA aus einer Biogasprobe	66
5.4.1 Versuch 8: Amplifizieren der mcrA-RNA mittels qPCR	66
5.4.2 Versuch 9: Optimierung der qPCR-Reaktion	68
5.4.3 Versuch 10: Erstellen einer Standardkurve	70
5.4.4 Versuch 11: Überprüfung der mcrA-Konzentration in unterschiedlich gelagerten Biogasproben.....	73
6 Ausblick	76
7 Zusammenfassung	77
Literaturverzeichnis	78
Selbstständigkeitserklärung.....	81
Anhang 1	82
Anhang 2.....	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung von Biogas	3
Abbildung 2: Struktur der RNA.....	6
Abbildung 3: schematische Darstellung der RNA-Synthese	7
Abbildung 4: Darstellung einer Genstruktur	8
Abbildung 5: Zyklen einer PCR	13
Abbildung 6: DNA-bindende Farbstoffe für die qPCR	16
Abbildung 7: Das FRET-Prinzip	18
Abbildung 8: Das TaqMan- und molecular beacon-Prinzip der qPCR	18
Abbildung 9: schematische Darstellung eines Amplifikations-Diagrammes	19
Abbildung 10: RT-PCR-Programm	33
Abbildung 11: PCR-Programm	34
Abbildung 12: Ein RNA Nano Chip und die Befüllstation für eine RNA-Analyse mittels Bioanalyzer	37
Abbildung 13: Temperaturzyklus der qPCR in Versuch 8.....	46
Abbildung 14: RNA-Ausbeute verschiedener Extraktionsmethoden angewandt auf <i>E. coli</i>	50
Abbildung 15: Gelbild Versuch 1 - 5 verschiedene Methoden der RNA-Extraktion aus <i>E. coli</i>	52
Abbildung 16: Primer-BLAST-Ergebnis 16S rRNA-Primer gegen das <i>E. coli</i> - Gesamtgenom	54
Abbildung 17: Gelbild Versuch 2 – RT-PCR mit genspezifischen Primern	55
Abbildung 18: Gelbild Versuch 3 – RT-PCR mit Random Primern	57
Abbildung 19: Analyse zweier RNA-Extraktionsproben aus Versuch 4 mit dem Bioanalyzer	58
Abbildung 20: Gelbild Versuch 4 - Einsatz einer größeren RNA-Menge in der RT-PCR	59
Abbildung 21: Gelbild Versuch 5 – Veränderung des Denaturierungsschrittes in der RT- PCR.....	61
Abbildung 22: Gelbild RT-PCR und PCR-Proben aus Versuch 6	62
Abbildung 23: Gelbild Versuch 6 - Restriktionsverdau	63
Abbildung 24: Gelbild Versuch 7 – RNA-Extraktion aus einer Biogasprobe.....	65

Abbildung 25: qPCR-Ergebnis Versuch 8.....	67
Abbildung 26: Gelbild Versuch 8.....	68
Abbildung 27: Gelbild Versuch 9.....	69
Abbildung 28: Versuch 9 - qPCR-Datenanalyse	70
Abbildung 29: Versuch 10 – Erstellung zweier Standardkurven	71
Abbildung 30: Versuch 10 - Die zwei Standardkurven überlagert.....	72
Abbildung 31: Gelbild Versuch 11 – RNA-Qualität zweier unterschiedlich gelagerter Biogasproben	74
Abbildung 32: Versuch 11 – Amplifikationsdiagramm unterschiedlich gelagerter Biogasproben	74

Tabelle 1: Struktur des prokaryotischen Ribosoms	11
Tabelle 2: Pipettierschema für den 2 x RT Master Mix des High Capacity cDNA RT Kits.....	32
Tabelle 3: Pipettierschema für den Master Mix der PCR.....	33
Tabelle 4: Reaktionsansätze im Versuch 4.....	38
Tabelle 5: Denaturierungszeit verschiedener RT-PCR-Reaktionsansätze im Versuch 5	39
Tabelle 6: Probennummerierung Versuch 6	41
Tabelle 7: Pipettierschema Restriktionsverdau.....	41
Tabelle 8: Pipettierschema für den qPCR Master Mix	45
Tabelle 9: paarweiser t-Test für verschiedene Methoden der RNA-Extraktion aus <i>E. coli</i>	51

Abkürzungsverzeichnis

BB	Bead Beating - Extraktionsmethode
cDNA	komplementäre (engl. <i>complementary</i>) DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EP	Extraktionspuffer und Proteinase K - Extraktionsmethode
GTC	Guanidinthiocyanat - Extraktionsmethode
MP	MasterPure™ RNA Purification Kit - Extraktionsmethode
mRNA	Messenger RNA
nr-Datenbank	nicht-redundante Datenbank
NT	No Template
ORF	offenes Leseraster (engl. <i>open reading frame</i>)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
qPCR	real-time quantitative Polymerasekettenreaktion
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonucleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuclease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion
TRI	TRI Reagent LS und Ultraschall – Extraktionsmethode
tRNA	Transfer RNA
UTR	nichttranslatierte Region (engl. <i>untranslated region</i>)

1 Einleitung & Zielstellung

Ende 2012 waren in Deutschland 7600 Biogasanlagen in Betrieb, gegenüber dem Jahr 2007 hat sich die Zahl der Biogasanlagen verdoppelt. Damit ist Biogas unter den erneuerbaren Energien zu einem führenden Energieträger in Deutschland geworden [URL-1]. Da sich Prozessstörungen negativ auf die Wirtschaftlichkeit einer Biogasanlage auswirken, ist es von außerordentlicher Wichtigkeit diese möglichst schnell zu erkennen, um sie beheben zu können. Verändern sich Überwachungsparameter wie die Biogasproduktionsrate, der pH-Wert oder die Gaszusammensetzung spricht dies für eine Prozessstörung. Doch je nachdem in welchem Zeitraum sich die Milieubedingungen zum Negativen verändert haben, zeigt sich auch die Prozessstörung nur mehr oder weniger schnell an [FNR, 2010 : S.105]. Desweiteren beschreiben solche Parameter den Zustand einer Anlage nur teilweise. Daher wäre es sinnvoll, eine Überwachung auf RNA-Ebene (Transkriptom) durchzuführen. Die Regulation der Transkription wird in hohem Maß vom Lebensraum der Zelle beeinflusst. Mikroorganismen „müssen schnell auf Veränderungen in ihrem Lebensraum reagieren (...), um den größtmöglichen Nutzen aus allen zur Verfügung stehenden Quellen zu ziehen“ [Madigan & Martinko, 2009 : S.230]. Demnach könnten mit einer Transkriptomanalyse Änderungen im Milieu der Biogasanlage früher entdeckt werden. Ein großer Erfolg wäre es, Markergene für bestimmte Zustände in einer Biogasanlage zu entdecken.

Bevor dies gelingen kann, muss es jedoch möglich sein, qualitativ hochwertige RNA aus allen Mikroorganismen einer Umweltprobe extrahieren zu können. Zu diesem Thema konnte ich im Rahmen meiner Masterarbeit an einer Veröffentlichung (siehe Anhang 2) mitwirken. Da die Forschung auf dem Gebiet der Transkriptomanalyse für die Überwachung von Biogasanlagen noch ganz am Anfang steht, war es das Ziel meiner Arbeit zunächst, für die Transkriptomanalytik wichtige Methoden, wie die RT-PCR und qPCR anhand der 16S rRNA von *E. coli* bzw. an dem *mcrA*-Gen aus einer Biogasprobe im Forschungslabor der Hochschule Mittweida zu etablieren.

2 Grundlagen

2.1 Die Biogasanlage

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung verschiedener Methoden zur Transkriptomanalytik von Fermenterproben einer Biogasanlage (im folgenden kurz *Biogasproben* genannt). Ein großes Ziel ist es, neue Überwachungsparameter für einen stabilen Betrieb einer Biogasanlage zu bekommen. Aufgrund dessen möchte ich an dieser Stelle kurz auf die Entstehung von Biogas, sowie die derzeitige Überwachung von Biogasanlagen eingehen.

2.1.1 Die Entstehung von Biogas

Bei der Biogasproduktion werden verschiedene organische Stoffe in einem anaeroben Prozess abgebaut und über verschiedene Zwischenschritte durch eine Vielzahl von Mikroorganismen fast vollständig zu Biogas umgewandelt. Dieses Gas besteht zu etwa 50-75 Vol.-% aus Methan und zu 20-50 Vol.-% aus Kohlenstoffdioxid. Es enthält ebenfalls geringe Mengen an Wasserstoff, Schwefelwasserstoff, Ammoniak und anderen Spurengasen. Der Entstehungsprozess von Biogas lässt sich in vier verschiedene Teilschritte unterteilen (Abbildung 1). Am Anfang des Prozesses stehen komplexe organische Verbindungen wie Kohlenhydrate, Eiweiße oder Fette. Substrate, die in einer Biogasanlage verwendet werden können und diese Ausgangsstoffe liefern, sind zum Beispiel Gülle, Silagen oder Nebenprodukte aus der Weiterverarbeitung pflanzlicher Rohstoffe. Bei dem ersten Abbauschritt, der *Hydrolyse*, erfolgt eine enzymatische Spaltung der Ausgangsstoffe in einfachere organische Verbindungen wie Zucker, Aminosäuren oder Fettsäuren. In der *Acidogenese* (auch Versäuerungsphase genannt) werden diese Produkte von fermentativen Bakterien zu niedermolekularen Fettsäuren (Essig-, Propion- und Buttersäure), Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid abgebaut. In geringen Mengen entstehen ebenfalls Milchsäure und Alkohole. Acetogene Bakterien setzen diese Zwischenprodukte in der *Acetogenese* zu Essigsäure, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid, den Vorläufersubstanzen des Biogases, um. Im letzten Schritt, der *Methanogenese*, setzen strikt anaerobe methanogene Archaeen die Essigsäure, den Wasserstoff und das Kohlenstoffdioxid zu Methan um. Die Umwandlung von Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid zu Methan erfolgt durch

hydrogenotrophe Methanogene, die acetoclastischen Methanbildner bilden Methan durch Essigsäurespaltung. Die genannten Abbauphasen laufen zeitlich parallel ab. Währenddessen muss das Milieu den Anforderungen aller beteiligten Bakterien, beispielsweise in Bezug auf Temperatur oder pH-Wert, gerecht werden. Da diese jedoch ganz unterschiedlich sind, ist die Herausforderung einen Kompromiss zu finden, bei dem alle Bakterien gut arbeiten können und ein stabiler Prozess in der Biogasanlage möglich ist [FNR, 2010 : S.21-22].

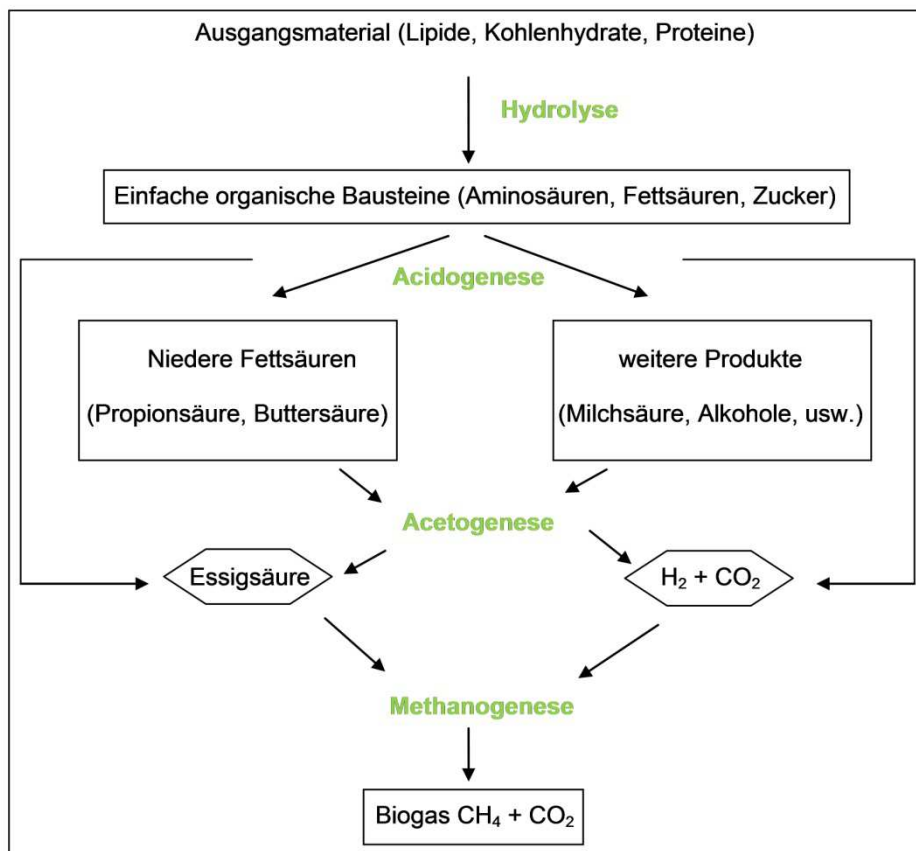


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung von Biogas [erstellt nach FNR, 2010 : S.21]

2.1.2 Prozessstörungen und derzeitige Überwachungsmöglichkeiten einer Biogasanlage

Unvermeidbar gibt es aber etliche Gründe für die Prozessschwankungen einer Biogasanlage, so zum Beispiel eine plötzliche Substratumstellung, Fehler im technischen Betrieb der Anlage, Temperaturschwankungen oder hemmende Substanzen. Haben sich die Milieubedingungen aus irgendeinem Grund für die Bakterien oder einzelne Bakteriengruppen negativ verändert, kommt es zur Störung des biologischen

Prozesses. Diese verläuft dann typischerweise wie folgt: Zunächst kommt es zum Anstieg der Fettsäurekonzentration und parallel zum kontinuierlichen Anstieg des FOS/TAC-Verhältnisses¹. Nachfolgend vermindern sich der Methangehalt und der Gasertrag trotz konstanter Fütterung. Mit dem folgenden Absinken des pH-Wertes kommt es zur Versäuerung des Prozesses und schließlich zum völligen Zusammenbruch der Gasproduktion. Um Störungen frühestmöglich zu erkennen, gibt es wichtige Kenndaten, die zur Überwachungen des biologischen Prozesses regelmäßig überprüft werden sollten. Dazu gehören:

- Biogasproduktionsrate
- Gaszusammensetzung hinsichtlich Methan-, Kohlendioxid-, Wasserstoffgehalt aber auch in Bezug auch auf Sauerstoff- und Schwefelwasserstoffgehalt
- Temperatur
- genaue Messung der zugegebenen Substratmenge
- Bestimmung der Füllstände
- Substratkonzentration und –zusammensetzung, indem Parameter wie Trockensubstanzgehalt (TS), organischer Trockensubstanzgehalt (oTS), der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) oder der Total Organic Carbon (TOC) überprüft werden
- Konzentration von organischen Säuren
- pH-Wert
- Konzentration an Spurenelementen
- Stickstoff-, Ammonium- und Ammoniakkonzentration
- Bildung von Schwimmdecken oder Schaum

[FNR,2010 : S.86-105]

Die Überwachung solcher Parameter kann den Zustand einer Biogasanlage jedoch nur teilweise beschreiben. Mehr Erkenntnisse könnte eine Überwachung der Aktivität der Mikroorganismen auf RNA-Ebene liefern.

¹ Der FOS/TAC-Wert beschreibt das Verhältnis von **Flüchtigen Organischen Säuren** zum **Totalen Anorganischen Carbon**

2.2 Die RNA

Für die Arbeit mit RNA ist es unerlässlich zunächst einmal zu klären, was RNA überhaupt ist, wie sie gebildet wird und was im Umgang mit ihr zu beachten ist. Auf diese Themen möchte ich in diesem Kapitel näher eingehen.

2.2.1 Aufbau der RNA und Unterschiede zur DNA

Neben der Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist die Ribonucleinsäure (RNA) die zweite essentielle Nucleinsäure, die jeder Organismus besitzt. Beide setzen sich aus Nukleotiden zusammen. Diese wiederum bestehen aus einer Phosphatgruppe, einer Pentose und einer Base. Die RNA enthält als Pentose die Ribose, welche an der 2'-Position eine Hydroxylgruppe besitzt. Diese Hydroxylgruppe fehlt bei der Desoxyribose, dem C₅-Zucker der DNA. Am Zucker kann eine der folgenden stickstoffhaltigen Basen gebunden sein: im Falle der DNA sind dies Guanin, Cytosin, Thymin oder Adenin; bei der RNA ersetzt Uracil Thymin. Durch eine Phosphodiesterbindung zwischen zwei Zuckermolekülen werden die Nukleotide miteinander verknüpft. Dabei verbindet das Phosphat die 5'-OH-Gruppe des einen Zuckermoleküls mit der 3'-OH-Gruppe des anderen. Die Basen ragen frei aus dem Zucker-Phosphat-Rückgrat heraus (Abbildung 2). Im Falle der DNA lagern sich zwei Einzelstränge antiparallel zu einer Doppelhelix zusammen, indem jede Base des einen Strangs mit einer komplementären Base des anderen Strangs Wasserstoffbrücken ausbildet. Paaren können sich Guanin mit Cytosin über drei Wasserstoffbrücken oder Adenin mit Thymin (bzw. Uracil) über zwei Wasserstoffbrücken. Im Gegensatz zur DNA liegt die RNA, mit wenigen Ausnahmen, als Einzelstrang vor. Die in DNA und RNA enthaltenen Informationen werden durch die Reihenfolge der Nukleotide gespeichert [Clark & Pazdernik, 2009 : S.3 ; Mühlhardt, 2009 : S.2-3].

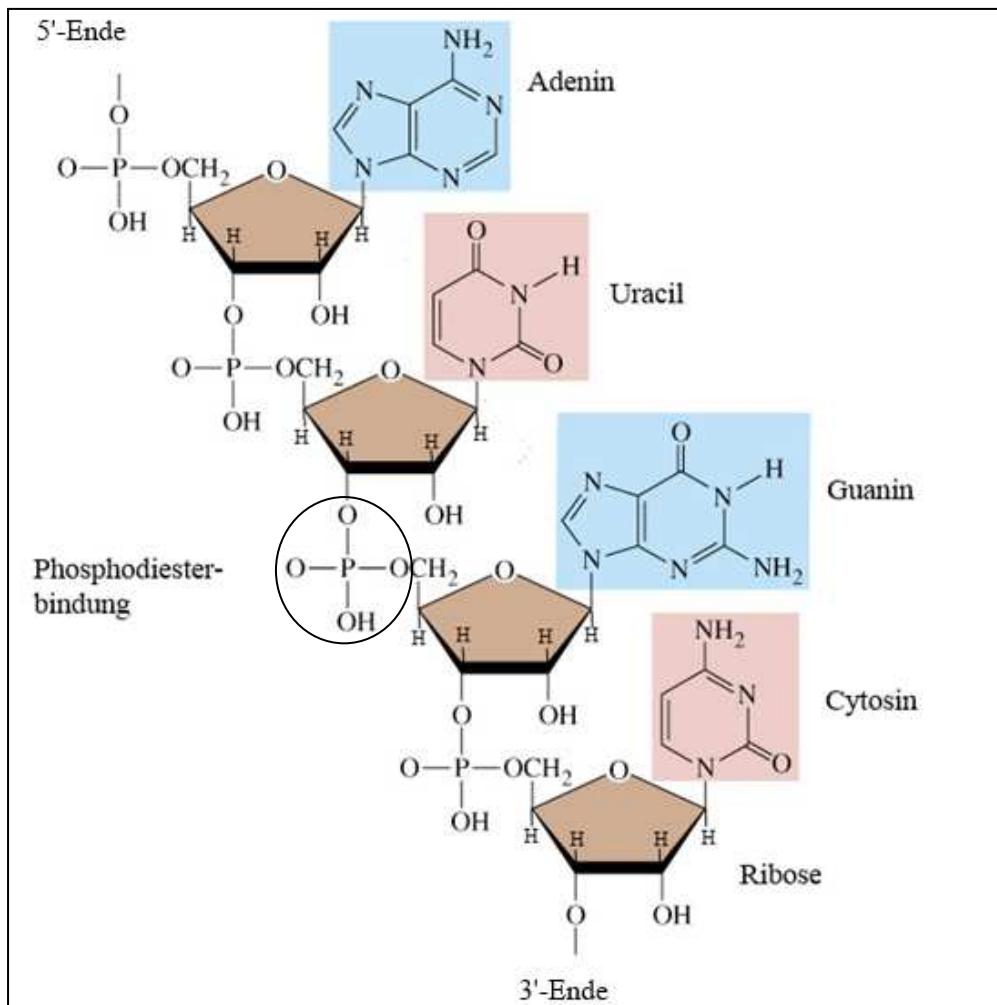


Abbildung 2: Struktur der RNA [modifiziert nach URL-2]

Einzelsträngige RNA, bestehend aus verschiedenen Nukleotiden, welche über Phosphodiesterbindungen verknüpft sind. Die Nukleotide setzen sich jeweils aus dem C₅-Zucker Ribose, einer Base und einer Phosphatgruppe zusammen. Mögliche Basen sind Adenin, Uracil, Guanin und Cytosin.

2.2.2 RNA-Synthese durch Transkription in Prokaryoten

Jeder lebende Organismus muss aus den in der DNA codierten Informationen selbstständig Proteine synthetisieren können. Dieser Vorgang wird als zentrales Dogma der Molekularbiologie bezeichnet. Es besagt, dass die Information von der DNA zur RNA (Transkription) und von der RNA weiter zum Protein (Translation) fließt. Proteine sind essentiell und werden beispielsweise für die Katalyse verschiedener Reaktionen im Energiestoffwechsel, für den Aufbau und die Struktur einer Zelle, als membrandurchspannende Kanäle zum Stoffaustausch zwischen den Zelle sowie für die Regulation sämtlicher zellulärer Prozesse benötigt. Bei der Transkription wird die DNA im Bereich des entsprechenden Gens entwunden und die beiden DNA-Stränge werden voneinander getrennt. Die RNA-Polymerase bindet am Matrizenstrang und fixiert

diesen in ihrer tiefen Furche. Für die Synthese der RNA mit komplementärer Sequenz zum Matrizenstrang werden Nukleotide in 5'→3'-Richtung miteinander verknüpft. Der wachsende RNA-Strang wird von der kleineren Furche der RNA-Polymerase festgehalten. Der gegenüberliegende DNA-Strang des Matrizenstrangs wird als codierenden Strang bezeichnet, denn dessen Sequenz entspricht (mit Ausnahme des Austausches von Thymin gegen Uracil) exakt der Sequenz, der neugebildeten RNA (siehe Abbildung 3) [Clark & Pazdernik, 2009 : S.32-35].

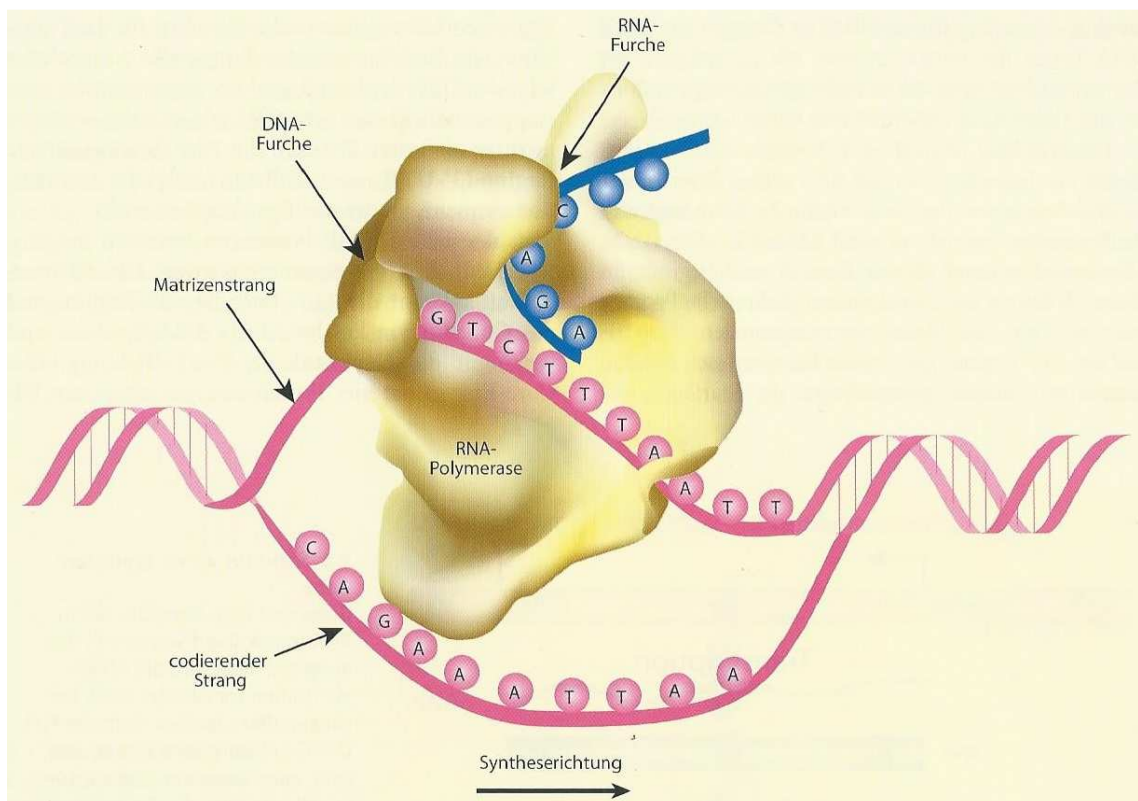


Abbildung 3: schematische Darstellung der RNA-Synthese [Clark & Pazdernik, 2009 : S.34]
 Die Stränge der DNA-Doppelhelix werden voneinander getrennt, sodass die RNA-Polymerase am Matrizenstrang binden und einen komplementären RNA-Strang in 5'→3'-Richtung synthetisieren kann.

Als Erkennungssequenz für den Transkriptionsstart dient der RNA-Polymerase die Promotorregion, ein Bereich stromaufwärts der codierenden Sequenz gelegen. Das Stoppsignal bildet die Terminationssequenz. Zwischen Promotor und Terminationssequenz befinden sich die 5'-nichttranslatierte Region (engl. *5' untranslated region*, 5'-UTR), ein offenes Leseraster (engl. *open reading frame*, ORF) und die 3'-UTR. Die 5'- und 3'-UTR enthalten relevante regulatorische Elemente für die Proteinsynthese, das ORF umfasst die codierende Sequenz. Ist das Gen

vollständig in RNA umgeschrieben, löst sich die RNA von der DNA und deren Doppelstränge lagern sich wieder zusammen. Die RNA besitzt nun die 5'-UTR, das ORF und die 3'-UTR (Abbildung 4). In den meisten Fällen wird über ein RNA-Zwischenprodukt ein Protein codiert. Dazu werden „proteincodierende Gene zunächst in mRNA (*messenger RNA*) transkribiert und anschließend in ein Protein translatiert. Andere RNA-Moleküle wie tRNA (und) rRNA (...) werden dagegen direkt verwendet [Clark & Pazdernik, 2009 : S.32-33]“. Die RNA spielt daher auf zwei Ebenen eine wichtige Rolle. Auf genetischer Ebene wird die genetische Information der DNA auf die mRNA übertragen. Die RNA kann auf funktioneller Ebene aber auch ein selbstständiges Makromolekül sein, was eine funktionelle und strukturelle Aufgabe bei Ribosomen (rRNA) erfüllt oder bei der Translation für die Übertragung von Aminosäuren verantwortlich ist (tRNA) [Madigan & Martinko, 2009: S.209].

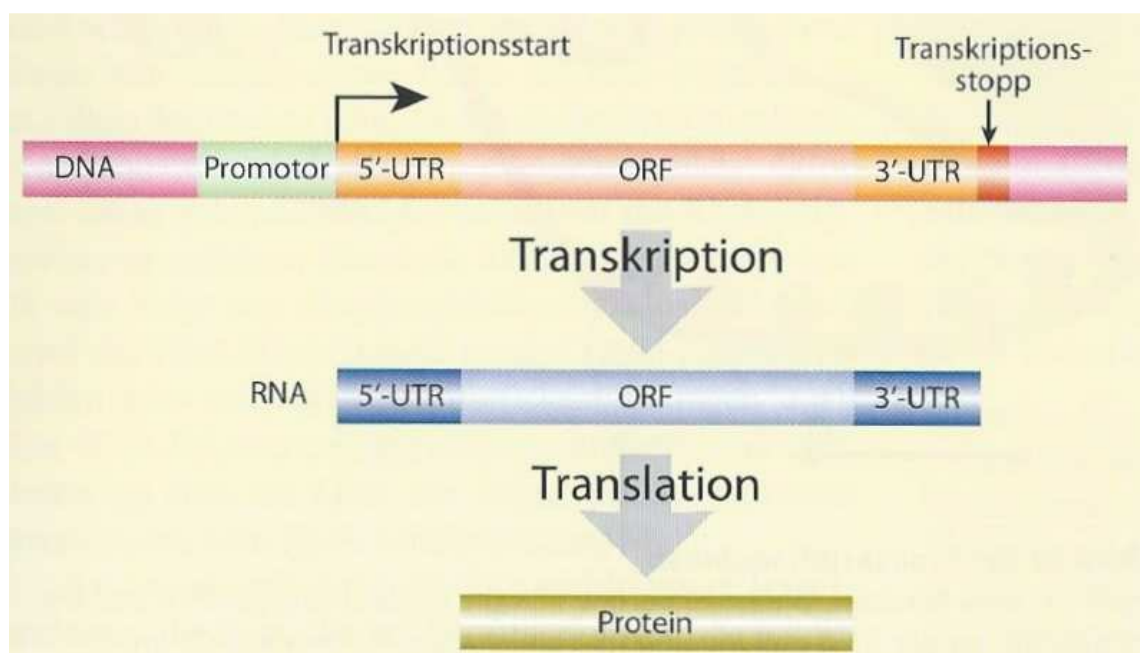


Abbildung 4: Darstellung einer Genstruktur [Clark & Pazdernik, 2009 : S.33]

Eine typische Genstruktur besteht aus einer Promotorregion und einem Terminationssignal, welche die codierende Sequenz (ORF) und regulatorische Sequenzen (UTR) umschließen und der RNA-Polymerase als Start- bzw. Stoppsignal für die Transkription dienen. Die synthetisierte mRNA besteht aus 5'-UTR, ORF und 3'-UTR. Handelt es sich um ein proteincodierendes Gen, wird anschließend nur das ORF in das Protein translatiert. Seltener ist jedoch auch die RNA das Endprodukt.

Auf den Chromosomen der Prokaryoten befinden sich Gene, die für Produkte desselben Stoffwechselweges codieren, häufig in enger Nachbarschaft. Diese Gene können zu einem Gencluster zusammengefasst werden, der nur einen Promotor und eine Terminationssequenz besitzt. Daraus wird dann ein einzelner langer mRNA-Strang

transkribiert, welcher mehrere Strukturgene oder Cistrons besitzt. Solche Gencluster werden auch Operons genannt. Das aus ihnen resultierende Transkript bezeichnet man als polycistronische mRNA. Die verschiedenen Cistrons werden einzeln translatiert, „sodass voneinander getrennte Proteine entstehen. Bei Eukaryoten (hingegen) sind die Gene häufig durch lange DNA-Bereiche getrennt, die kein Protein codieren. Außerdem hat jede mRNA nur ein Cistron und wird daher monocistronische mRNA genannt“ [Clark & Pazdernik, 2009 : S.35].

Nicht alle Gene einer Zelle oder eines Organismus werden gleichzeitig transkribiert, dafür gibt es die Möglichkeit der Regulation der Transkription. In *E. coli* beispielsweise werden etwa 1000 der 4000 Gene gleichzeitig exprimiert. Verschiedene Aktivator- und Repressorproteine bestimmen, welche Gene transkribiert werden und welche nicht. Aktivatorproteine wirken sich positiv auf eine Transkription aus, das heißt diese findet nur statt, wenn der Aktivator ein positives Signal liefert. Repressorproteine hingegen regulieren die Transkription negativ, sie müssen erst entfernt werden bevor die Transkription stattfinden kann. Andere regulatorische Proteine können auch die Elongation hemmen, eine vorzeitige Termination signalisieren oder zu einem Überlesen des Terminationssignals führen. Selbst in einfachen Prokaryoten ist die Regulation der Transkription schon sehr komplex [Clark & Pazdernik, 2009 : S.38].

2.2.3 Das Metatranskriptom

Die Gesamtheit aller vom Genom transkribierten mRNAs, die zu einem bestimmten Zeitpunkt unter einem gegebenen Satz von Rahmenbedingungen in einer Zelle oder einem Organismus vorliegen, bezeichnet man als **Transkriptom** der Zelle bzw. des Organismus [Madigan & Martinko, 2009: S.540/562; Wink, 2011: S.256]. Als **Metatranskriptom** wird die Gesamtheit, der aus einer Umweltprobe isolierten Transkriptome bezeichnet. Es beinhaltet demnach die Transkriptome verschiedener Organismen einer Lebensgemeinschaft [abgeleitet aus Wink, 2011 : S.488].

Mit Hilfe von Metatranskriptomen ist es möglich, funktionelle Gensequenzen aktiver Zellen zu erhalten, ohne die Einschränkung zu haben vorher gewisse, eventuell sogar fehlerbehaftete, Sequenzinformationen besitzen zu müssen, wie es bei primerbasierten Analysen der Fall ist [Poretsky et al.,2005].

Da Zellen die Fähigkeit besitzen ihre Transkription zu regulieren und diese Regulationen in hohem Maß vom Lebensraum der Zelle abhängen [Madigan &

Martinko, 2009 : S.230] und desweiteren die meisten mRNA-Moleküle nach wenigen Minuten von zellulären Ribonucleasen (RNasen) abgebaut werden, sobald genügend entsprechendes Protein gebildet wurde [Madigan & Marttinko, 2009: S.215], bietet die Transkriptomanalyse Einblicke in den aktuellen Zustand einer Zelle oder Lebensgemeinschaft. Damit gelingt es neben Strukturinformationen auch Informationen über die Aktivität einer Zelle oder einer ganzen Lebensgemeinschaft zu erlangen [Burgmann et al.,2003].

2.2.4 Das Arbeiten mit RNA

Das Hauptproblem beim Arbeiten mit RNA stellen die ubiquitär vorkommenden RNasen dar. Jeder Organismus produziert sie und scheidet sie aus. Dazu kommt, dass etliche RNasen keine Cofaktoren benötigen um aktiv zu sein und zum anderen sehr stabil sind. Deshalb ist steriles Arbeiten von größter Bedeutung für ein erfolgreiches Arbeiten mit RNA. Man benötigt spezielle RNase-freie Pipettenspitzen, Tubes, Lösungen etc. Alles muss steril gelagert werden und auch sämtliche Pipetten und Geräte sollten regelmäßig von RNasen befreit werden. Alles sollte nach Möglichkeit ausschließlich für die RNA-Arbeit verwendet werden und sämtliche Arbeitsschritte sind mit Handschuhen auszuführen [Mülhardt, 2009 : S.118].

2.3 Die 16S rRNA und die Methyl Coenzym M Reduktase A (mcrA)

Die Etablierung verschiedener Transkriptomanalyse-Methoden habe ich für meine Masterarbeit sowohl an der 16S rRNA, als auch am mcrA-Transkript vorgenommen. Warum? Das werde ich in diesem Kapitel kurz erklären.

2.3.1 Die 16S rRNA

Die ribosomale RNA (rRNA) ist ein wichtiger Bestandteil von Ribosomen. Diese wiederum spielen eine Schlüsselrolle bei der Translation. Somit ist jede Zelle im Besitz einer Vielzahl von Ribosomen und somit auch von ribosomaler RNA. Das prokaryotische Ribosom besteht aus den Untereinheiten 30S und 50S, die zusammen das vollständige 70S-Ribosom bilden. Eine Untereinheit besteht aus einem Ribonucleoproteinkomplex. Dieser setzt sich wiederum aus spezifischen rRNAs und ribosomalen Proteinen zusammen. Die 30S-Untereinheit enthält etwa 21 Proteine und

die 16S rRNA. Die 50S-Einheit besteht aus circa 34 Proteinen sowie der 23S und 5S rRNA (siehe Tabelle 1) [Madigan & Martinko, 2009: S.221]. Da die rRNA essentiell für die Aufrechterhaltung der Proteinsynthese ist und daher zu jedem Zeitpunkt in großen Mengen in einer Zelle vorhanden ist, bezeichnet man die codierenden Gene als Housekeeping-Gene. Die rRNA ist die am häufigsten vorkommende RNA in einer Zelle [Farrell, 2010: S.8]. Zusammen mit der tRNA (*transfer RNA*) macht sie etwa 98 % der Gesamt-RNA einer Zelle aus [Mühlhardt, 2009: S.14]. Aufgrund ihrer Eigenschaften lassen sich mit der 16S rRNA phylogenetische Stammbäume erstellen und die Komplexität von Mikrobenpopulationen in Umweltproben entschlüsseln [Luton, 2002]. Somit ist die 16S rRNA hervorragend für die Etablierung einer neuen Methode geeignet.

Tabelle 1: Struktur des prokaryotischen Ribosoms [nach Madigan & Martinko, 2009: S.221]

Ribosom von Prokaryoten	Untereinheit	rRNA	Größe der rRNA	Anzahl der Proteine
70S	30S	16S	≈ 1500 nt	21
	50S	23S	≈ 2900 nt	34
		5S	≈ 120 nt	

2.3.2 Die Methyl Coenzym M Reduktase A (mcrA)

Methanogene sind essentielle Mikroorganismen für einen anaeroben Abbau organischer Verbindungen wie er in Biogasanlagen stattfindet. Sie katalysieren die Methanproduktion, vorzugsweise durch Kohlenstoffdioxidreduktion mit Wasserstoff oder durch die Umsetzung methylierter Komponenten wie Acetat. Realisiert wird dieser letzte Schritt im Stoffwechselweg der Methanogenese durch das Schlüsselenzym Methyl Coenzym M Reduktase (MCR). Die α -Untereinheit dieses Enzyms wird als mcrA bezeichnet. Der MCR-Enzymkomplex ist sowohl einzigartig für die Methanogenen, als auch ubiquitär und konserviert [Steinberg & Regan, 2008; Luton, 2002; Nettmann et al., 2008]. Somit eignet sich die RNA der mcrA ebenfalls bestens für die Etablierung einer neuen Methode.

2.4 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Da es in meiner Masterarbeit maßgeblich um die Etablierung einer RT-PCR- und qPCR-Methode ging, sollen diese Methoden an dieser Stelle erläutert werden.

2.4.1 Die Standard-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) gehört zu den wichtigsten Methoden der Molekularbiologie. Sie ermöglicht es, gezielt Genabschnitte, die nur in geringen Mengen zur Verfügung stehen, zu vervielfältigen. Benötigt wird dafür eine DNA-Matrize, ein Primerpaar, Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP) und eine DNA-Polymerase. Am häufigsten verwendet wird die *Taq*-Polymerase, so auch in dieser Arbeit.

Ein PCR-Zyklus setzt sich grundsätzlich aus drei verschiedenen Schritten zusammen. Zunächst findet eine **Denaturierung** bei etwa 94-96 °C statt. Dabei trennen sich die beiden Stränge der DNA-Matrize. Anschließend lagern sich im **Annealingschritt** ein forward- und ein reverse-Primer an ihre entsprechend komplementären Sequenzen der Matrize an. Die Primer werden so gewählt, dass sie die gewünschte Zielsequenz auf gegenüberliegenden Strängen umschließen und die Synthese in gegenläufige Richtung ablaufen kann. Das Annealing geschieht meist bei einer Temperatur zwischen 40 und 60 °C, wobei diese etwa 5-10 °C niedriger als die Schmelztemperatur der Primer gewählt werden sollte. Danach bindet die DNA-Polymerase an die DNA und verlängert während der **Elongation** bei 72 °C die Primer durch Verknüpfen komplementärer dNTPs in 5'→3'-Richtung. Die Elongationszeit sollte der Länge des zu erwartenden Produktes angepasst werden und unter Verwendung der *Taq*-Polymerase etwa 0,5-1 min je kb Länge betragen. Es schließt sich erneut eine Denaturierung an, bei der die Doppelstränge der neusynthetisierten DNA-Moleküle wieder voneinander getrennt werden. Durch fortwährende Wiederholung des Zyklus kann eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes erfolgen (siehe Abbildung 5) [Wink, 2011: S.149-150; Mülhardt, 2009: S.86-87].

Für eine erfolgreiche PCR müssen neben den entsprechenden Temperaturen auch zahlreiche andere Faktoren berücksichtigt werden.

- So muss beispielsweise der **pH-Wert** durch einen geeigneten Puffer auf das Aktivitätsmaximum der verwendeten DNA-Polymerase eingestellt werden. Bei der *Taq*-Polymerase liegt dieser über 8.

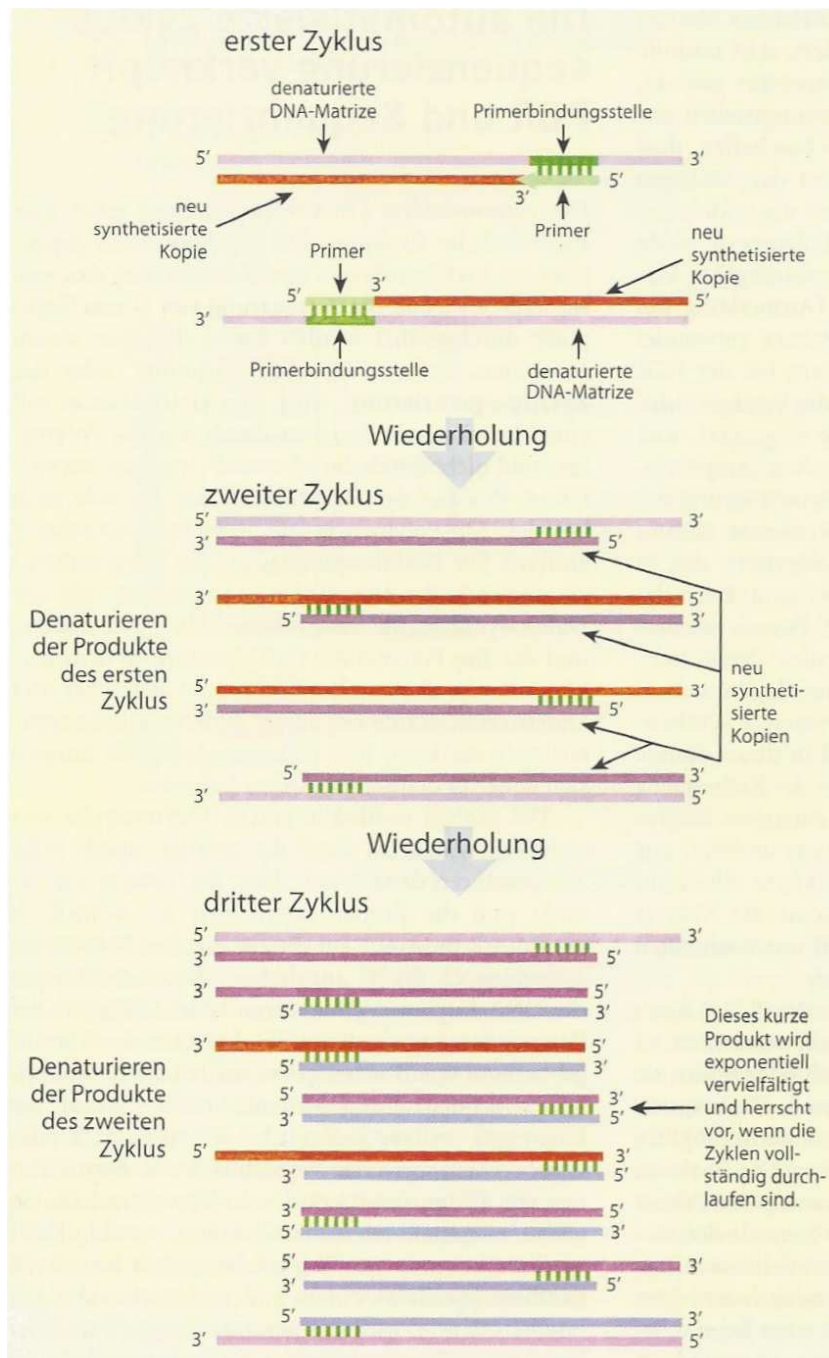


Abbildung 5: Zyklen einer PCR [Clark & Pazdernik, 2009: S.107]

Durch die zyklische Wiederholung von **Denaturierung** der DNA, Anlagerung komplementärer Primer an die Einzelstränge (**Annealing**) und die Synthese eines komplementären DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase (**Elongation**), gelingt es eine bestimmte Zielsequenz exponentiell zu vervielfältigen. In den ersten Zyklen entstehen dabei auch längere Stränge, die am Ende der PCR jedoch nur noch einen kleinen Teil des Produktes ausmachen.

- Desweiteren müssen Magnesiumchlorid, dNTPs, Primer und Polymerase in definierten Konzentrationen vorliegen. **Magnesiumionen** beeinflussen „Primerannealing, Trennung der Stränge bei der Denaturierung, Produktspezifität,

Bildung von Primerdimeren und die Fehlerrate [Mülhardt, 2009 : S.89].“
Desweiteren werden freie Magnesiumionen von der Polymerase benötigt.

- Eine zu hohe **dNTP**-Konzentration kann eine stark inhibierende Wirkung auf die PCR haben, da aufgrund dessen der hemmende Phosphatgehalt zu schnell ansteigt. Weiterhin hätte eine zu hohe dNTP-Konzentration negative Auswirkungen auf den Magnesiumgehalt, da Nucleotide freie Magnesiumionen binden.
- Die **Template**-Menge sollte ebenfalls nicht zu hoch gewählt werden. Dann steigt die Gefahr der Fehlbindung der Primer oder die Reaktion kann zu schnell in die Sättigung gelangen.
- Bei der Wahl der richtigen **Primer** gibt es so einiges zu beachten. Sie sind einzelsträngig und sollten etwa 18-30 Basen besitzen, 40-60 % Guanin und Cytosin (G und C) enthalten und nicht mehr als vier gleiche Basen in Folge besitzen um Fehlhybridisierungen zu vermeiden. Am Ende der Primersequenz sollten sich zwei bis drei G oder C befinden um die Bindung zu stabilisieren. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 55-80 °C liegen, um möglichst hohe Annealingtemperaturen zu ermöglichen. Ihre Sequenz muss spezifisch für das zu amplifizierende DNA-Fragment sein. Primer dürfen keine Sekundärstrukturen ausbilden und nicht miteinander hybridisieren.
- Die **Zyklenzahl** sollte so angepasst werden, dass die PCR beendet wird, wenn die Reaktion ihre stationäre Phase erreicht. Gründe für diesen Effekt sind beispielsweise die Abnahme der Substratkonzentrationen und die Anhäufung von Endprodukten die die Synthese verlangsamen, beispielsweise Pyrophosphat. Weiterhin steigt mit der Zunahme der DNA-Produkte die Wahrscheinlichkeit des Reannealing zweier DNA-Stränge und reduziert dadurch die Synthese neuer DNA-Stränge. Ebenso können die Polymerase und dNTPs durch anhaltend hohe Temperaturen irgendwann in Mitleidenschaft gezogen werden. Zu diesem Zeitpunkt steigt die Gefahr für eine unspezifische Produktbildung.

[Mülhardt, 2009 : S.88-92].

2.4.2 Die Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist die PCR-Anwendung, mit deren Hilfe RNA-Moleküle in ihre komplementäre DNA-Sequenz umgeschrieben werden können. Auch hier sind wieder entsprechende Primer notwendig, die an die RNA binden. Dann bindet das Enzym

Reverse Transkriptase an das 3'-Ende des Primers und synthetisiert einen Erststrang cDNA (*complementary DNA*), welcher komplementär zur RNA ist. Es schließt sich eine herkömmliche PCR mit spezifischen Primern, dNTPs und der Taq-Polymerase an, um die cDNA zu vervielfältigen. Mit dieser Technik lässt sich unter anderem die Expression eines Gens nachweisen und quantifizieren [Clark & Pazdernik, 2009: S.112; Mülhardt, 2009:S.101].

Für die RT-PCR wurden in dieser Arbeit sowohl spezifische Primer für eine bestimmte Zielsequenz verwendet, als auch sogenannte Random Primer. Random Primer sind, wie der Name verrät, zufällige Primer mit einer Länge von circa 10 Basen. Das Annealing wird bei weniger als 40 °C durchgeführt, sodass die Primer auch an nur teilweise komplementäre Sequenzen binden können. Das Ergebnis sind viele verschiedene Amplifikationsprodukte ganz unterschiedlicher Größen, die sich auf dem Agarosegel als gleichmäßiger Schmier darstellen [Mülhardt, 2009: S.104]. Diese Technik kann ebenso bei anderen PCR-Methoden angewandt werden.

2.4.3 Die real-time quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die real-time quantitative PCR, in dieser Arbeit mit qPCR abgekürzt, kann verwendet werden, wenn man wissen möchte wie viel eines bestimmten Gens in einer bestimmten Probe exprimiert wird. Eine solche Bestimmung ist aufgrund der exponentiellen Vervielfältigung des Amplifikationsproduktes möglich. Desweiteren lässt sich die PCR mit dieser Methode in Echtzeit verfolgen. Das qPCR-Verfahren basiert auf einer Fluoreszenzmessung, was sowohl etwas andere Reagenzien als die Standard-PCR, als auch ein PCR-Gerät mit UV-Licht und Kamera verlangt [Mülhardt, 2009: S.109-110].

Zur Fluoreszenzdetektion existieren im Großen und Ganzen zwei Nachweisverfahren. Zum einen Methoden, die auf DNA-bindende Farbstoffe basieren, zum anderen jene Methoden, die auf farbstoffmarkierte, sequenzspezifische Oligonucleotide (Sonden) aufbauen.

DNA-bindende Farbstoffe

Der am häufigsten und auch in dieser Arbeit verwendete Farbstoff für diese Methode ist SYBR Green I. Dieser interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA. Ungebunden verursacht SYBR Green I ein sehr geringes Fluoreszenzsignal (Hintergrundrauschen), doch dieses erhöht sich um das 1000fache sobald der Farbstoff gebunden ist. Dadurch ist das Fluoreszenzsignal einer Reaktion proportional zur Menge doppelsträngiger DNA

und steigt an, je mehr Amplifikationsprodukt gebildet wird (siehe Abbildung 6) [URL-3].

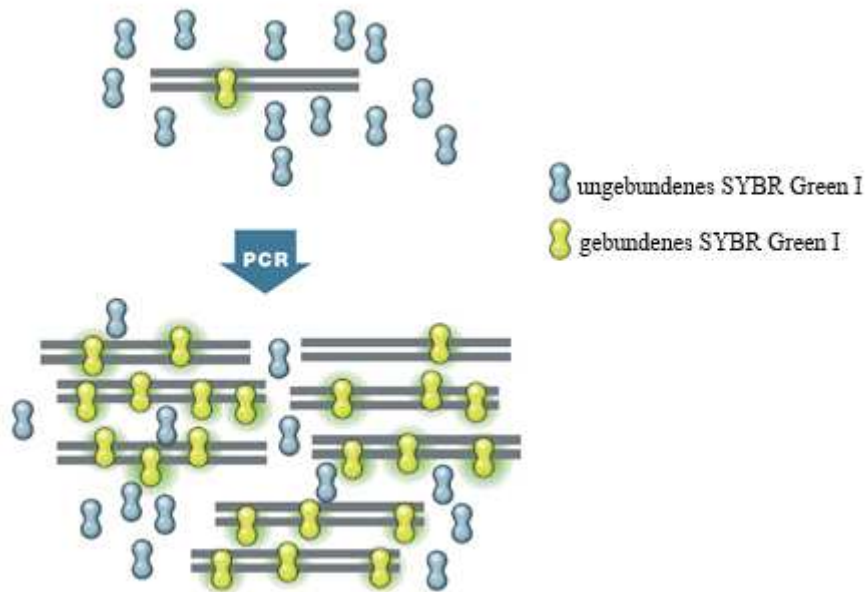


Abbildung 6: DNA-bindende Farbstoffe für die qPCR [URL-3: S.10]

Sobald der Farbstoff unspezifisch an die doppelsträngige DNA bindet, verstärkt sich das Fluoreszenzsignal um ein Vielfaches.

Die Vorteile dieser Methode liegen in einem einfachen und kostengünstigen Versuchsaufbau sowie der Möglichkeit einer Schmelzkurvenanalyse. Mit einer Schmelzkurvenanalyse können verschiedene Reaktionsprodukte, so auch unspezifische Produkte, identifiziert werden. Dafür wird nach Beendigung der PCR-Reaktion die Temperatur schrittweise in kleinen Abständen erhöht und jeweils das Fluoreszenzsignal gemessen. Wenn die doppelsträngige DNA denaturiert, wird auch das SYBR Green I wieder frei und das Fluoreszenzsignal nimmt ab. In einem Diagramm wird die Veränderung der Fluoreszenzstärke gegen die Temperatur aufgetragen. Bei der Schmelztemperatur des Amplikons sollte in der grafischen Auswertung ein charakteristischer Peak zu sehen sein. Treten auch weitere Peaks auf, lässt dies auf unspezifische Produkte schließen. Nachteil der Methode ist jedoch, dass der Farbstoff unspezifisch bindet. Somit erhöhen auch unspezifische Produkte, falls vorhanden, das Fluoreszenzsignal und beeinflussen so die Quantifizierung. Weiterhin erlaubt diese Methode auch keine Durchführung von Multiplex-Reaktionen, das heißt das Amplifizieren mehrerer Fragmente in demselben Reaktionsgefäß [URL-3].

Mit Farbstoff markierte Oligonucleotide

Obwohl in dieser Arbeit nicht verwendet, möchte ich der Vollständigkeit halber auch diese Methode kurz erklären. Es existieren verschiedene Nachweisverfahren (beispielsweise TaqMan® oder molecular beacons), die alle auf dem FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)-Prinzip beruhen. Das FRET-Prinzip besagt, dass sich ein Fluoreszenzfarbstoff (F1) mit einer bestimmten Wellenlänge (A1) anregen lässt und die Energie anschließend als Licht mit einer anderen spezifischen Wellenlänge (E1) wieder abstrahlt. Anregungs- und Emissionsspektrum sind dabei für jeden Fluoreszenzfarbstoff charakteristisch. Befindet sich nun ein zweiter Fluoreszenzfarbstoff (F2) in ausreichender Nähe des ersten und sein Anregungsspektrum entspricht dem Emissionsspektrum des ersten Farbstoffes, so wird E1 nicht abgestrahlt, sondern direkt an den zweiten Farbstoff weitergegeben. F2 strahlt dann Licht der Wellenlänge E2 ab. Je nachdem wie nah beieinander bzw. weit entfernt voneinander sich die beiden Fluoreszenzfarbstoffe befinden, kann Licht der Wellenlänge E2 bzw. E1 gemessen werden. Siehe dazu auch Abbildung 7. Befinden sich die Farbstoffe in ausreichender Nähe, sodass E2 gemessen wird, werden F1 und F2 Donor und Akzeptor genannt. Im Falle einer E1-Messung wird F1 als Reporter und F2 als Quencher bezeichnet [Mülhardt, 2009: S.109-111].

Das **TaqMan**-Prinzip beruht auf einer Sonde, die spezifisch an die Zielsequenz bindet und an ihrem 5'-Ende einen fluoreszenzmarkierten Reporter, am 3'-Ende einen Quencher besitzt. Ist die Sonde intakt, wird kein Emissionssignal des Reporters gemessen. Stößt die Polymerase bei der Verlängerung des komplementären DNA-Stranges auf das Oligonucleotid, spaltet sie den Reporter ab und dieser gibt ein Fluoreszenzsignal ab. Für das **molecular beacon**-Verfahren benötigt es ein farbstoffmarkiertes Oligonucleotid mit einem Reporter am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende, das eine Haarnadelstruktur ausbildet. In der Haarnadelstruktur sind Reporter und Quencher nah beieinander, sodass kein Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Bindet die Sonde an die Zielsequenz, reicht die Entfernung von Reporter und Quencher aus, um ein Fluoreszenzsignal zu verursachen (Abbildung 8) [URL-3].

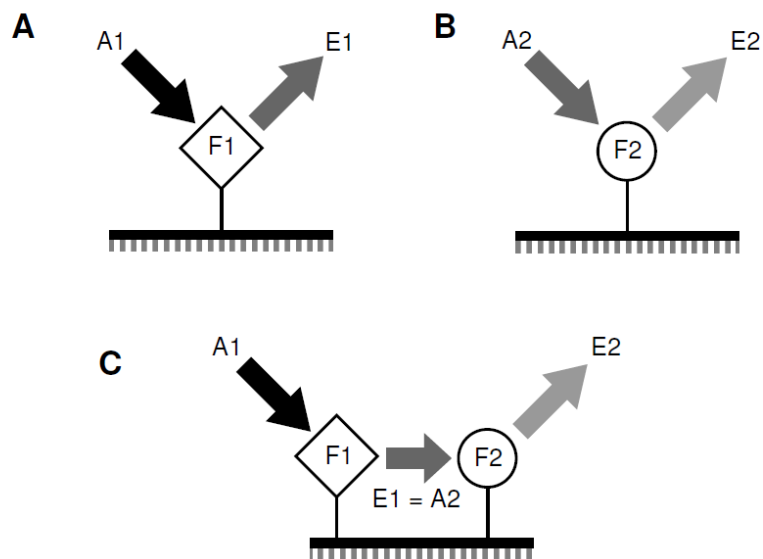


Abbildung 7: Das FRET-Prinzip [Mülhardt, 2009: S.110]

Zwei Fluoreszenzfarbstoffe besitzen je ein charakteristisches Anregungs- und Emissionsspektrum ($A1/2$ und $E1/2$). Der Versuchsaufbau wird mit Licht der Wellenlänge $A1$ angestrahlt. Entspricht $E1$ $A2$ und befinden sich die beiden Farbstoffe in ausreichender Nähe zueinander, wird der Farbstoff 2 mit diesem Licht angeregt und es wird Licht der Wellenlänge $E2$ abgestrahlt. Sind die beiden Farbstoffe jedoch zu weit voneinander entfernt, ist Licht der Wellenlänge $E1$ zu messen.

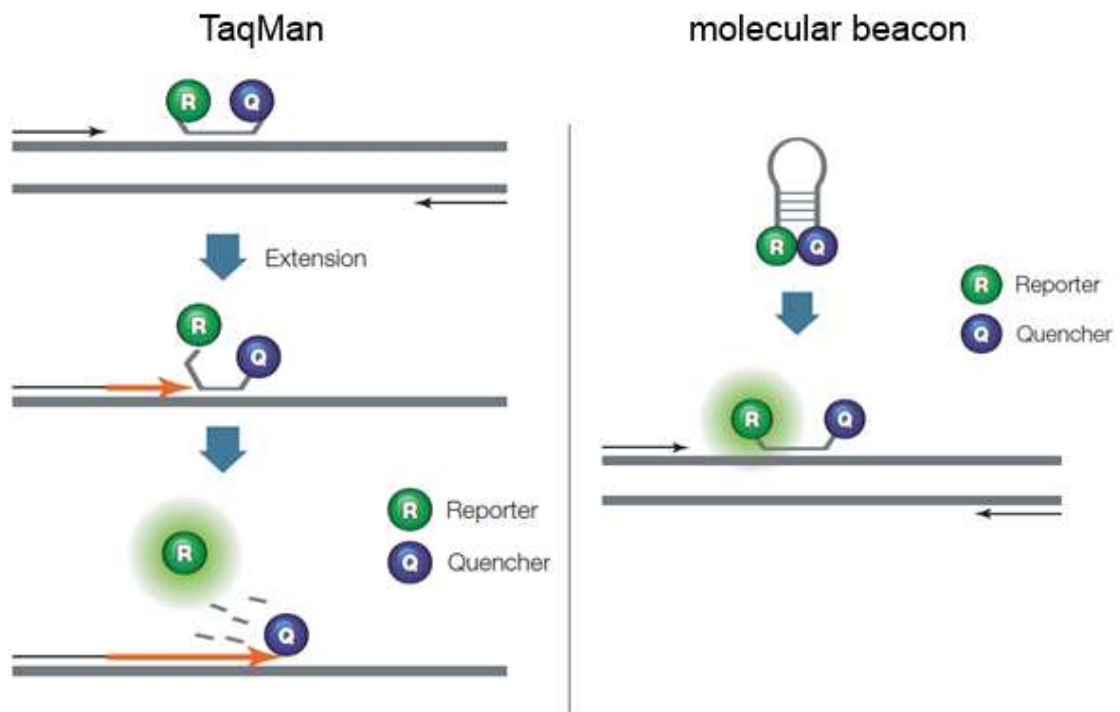


Abbildung 8: Das TaqMan- und molecular beacon-Prinzip der qPCR [URL-3: S.13]

TaqMan-Sonden fluoreszieren, sobald der Reporter von der Polymerase abgespalten wurde. Bei einer Molecular beacon-Sonde werden Reporter und Quencher durch das Binden an der DNA separiert, sodass ein Fluoreszenzsignal entsteht.

Weitere Methoden (zum Beispiel hybridization probe oder eclipse probe) funktionieren nach einem ähnlichen Prinzip. Die Fluoreszenzsignale aller Methoden steigen proportional zur Menge des gebildeten Amplifikationsproduktes an. Die Vorteile dieser Methoden liegen in ihrer hohen Spezifität und der Möglichkeit einer Multiplex-PCR. Jedoch ist das Design der Sonden nicht unkompliziert und die Methoden sind kostenintensiver.

Doch wie lässt sich nun die Menge eingesetzter Ausgangs-DNA mit dieser Methode bestimmen? Das Fluoreszenzsignal wird vom PCR-Gerät aufgezeichnet und in einem Diagramm zugehörig zur Zyklenzahl aufgetragen. Ein solches Ergebnis ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt. Zu Beginn übersteigt das Fluoreszenzsignal ein gewisses Hintergrundrauschen (unterhalb der Threshold-Linie) nicht. Es ist noch keine Steigerung des Signals messbar, obwohl sich das Produkt bereits exponentiell vermehrt. Der Zeitpunkt zu dem genug Produkt gebildet ist, sodass das Signal messbar wird, gibt den sogenannten C_T -Wert (*threshold cycle*, auch C_q -Wert) an. Dieser entspricht der Zyklenzahl, bei welcher der Threshold überstiegen wird. Dieser Wert wird gemessen, wenn sich die Reaktion in ihrer exponentiellen Phase befindet und wird hauptsächlich durch die eingesetzte Template-Menge bestimmt. Je weniger eingesetzt wurde, desto später erhält man den C_T -Wert. Damit erlaubt der C_T -Wert eine genaue Berechnung der eingesetzten DNA-Ausgangsmenge [URL-3].

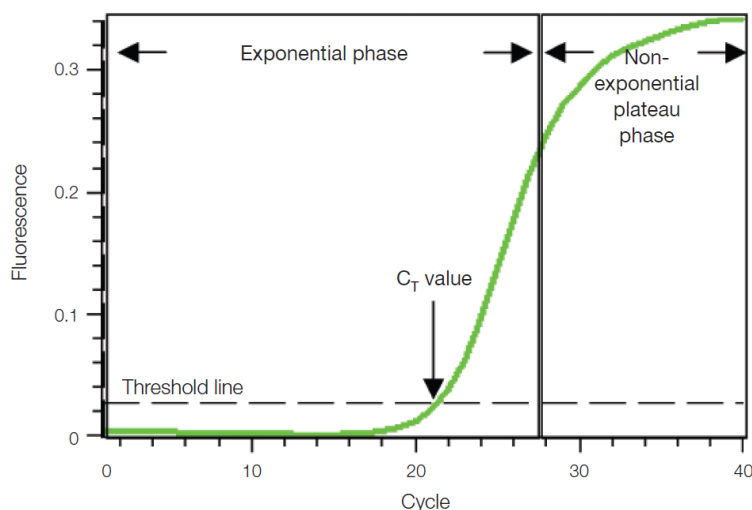


Abbildung 9: schematische Darstellung eines Amplifikations-Diagrammes [URL-3: S.3]

Zunächst übersteigt das Fluoreszenzsignal das Hintergrundrauschen nicht. Die Zyklennummer, bei der genügend Amplifikationsprodukt gebildet werden konnte, um den Threshold zu übersteigen gibt den C_T -Wert an. Dieser wird in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion gemessen und hängt von der Menge der Ausgangs-DNA ab.

3 Material

3.1 Chemikalien

- **2-Propanol** $\geq 99,5$ %, Ph. Eur., reinst, Carl Roth GmbH + Co.KG
- **Agar-Agar**, Kobe I, pulv., Carl Roth GmbH + Co.KG
- **Agarose** NEEO Ultra-Qualität, Rotⁱ® agarose für die DNA/RNA-Elektrophorese, Carl Roth GmbH + Co. KG
- **Carboxymethylcellulose** Natriumsalz $\geq 99,5$ %, pulv., Carl Roth GmbH + Co.KG
- **Cetyltrimethylammoniumbromid** CTAB ≥ 98 %, Carl Roth GmbH + Co. KG
- **D(+)-Glucose Monohydrate** für die Mikrobiologie, VWR Prolabo
- **Diethylpyrocarbonat** DEPC ≥ 97 %, Carl Roth GmbH + Co. KG
- **di-Kaliumhydrogenphosphat** wasserfrei 99,99 Suprapur[®], Merck KGaA
- **Ethylendiamintetraessigsäure** EDTA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- **ElectroZap**TM, Ambion[®] by life technologiesTM
- **Ethanol** vergällt $\geq 99,8$ % mit ca. 1 % MEK, Carl Roth GmbH + Co.KG
- **Extraktionspuffer**
100 mM Tris-Hydrochlorid (pH 8,0)
100 mM Natrium-EDTA (pH 8,0)
100 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (pH 8,0)
1,5 M Natriumchlorid
1% CTAB
- **Fleischextrakt** trocken, granuliert, für die Mikrobiologie, Merck KGaA
- **Glycerin** $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- **Guanidinthiocyanat** ≥ 99 % reinst, Carl Roth GmbH + Co.KGo
- **Harnstoff** $\geq 99,5$ %, Ph. Eur., krist., Carl Roth GmbH + Co.KG
- **Hefeextrakt**, pulv., für die Bakteriologie, Carl Roth GmbH + Co.KG
- **Isoamylalkohol** $\geq 98,5$ %, Carl Roth GmbH + Co. KG
- **Kaliumchlorid** $\geq 99,5$ %, p.a., ACS, ISO, Merck KGaA
- **Ladungspuffer** xylen cyanol loading dye (5x), Bio-Rad Laboratories GmbH
- **Ladungspuffer Orange G**, 11x
10 mM Tris-Hydrochlorid (pH 7,6)
0,45 % Orange G
60 % Glycerin
60 mM EDTA

- **Magnesiumsulfat-Heptahydrat** zur Analyse ACS, Reag. Ph Eur, Merck KGaA
- **Mangan(II)-sulfat-Monohydrat** sprühgetrocknet zur Analyse EMSURE[®] ACS, Reag. Ph Eur, Merck KGaA
- **Natriumacetat** $\geq 98,5 \%$, reinst, wasserfrei, Carl Roth GmbH + Co.KG
- **Natriumchlorid** $\geq 99,9 \%$, CELLPURE[®], Carl Roth GmbH + Co.KG
- **Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat** $\geq 98 \%$, USP, Carl Roth GmbH + Co.KG
- **Natrium-EDTA** (Triplex III) Reag. Ph Eur, Merck KGaA
- **Natriumnitrat** krist. reinst FCC, E 251, Merck KGaA
- **N-Lauroylsarcosin** $\geq 98 \%$, Sigma-Aldrich[®] Chemie GmbH
- **Orange G** (CJ.16230) für die Mikroskopie und Elektrophorese, Carl Roth GmbH + Co. KG
- **Pepton** aus Casein pankreatisch verdaut, granuliert, für die Mikrobiologie, Carl Roth GmbH + Co. KG
- **RNase AWAY[®]**, Carl Roth GmbH + Co.KG
- **SYBR[®] Safe DNA Gel Stain**, 10.000x konzentriert in DMSO, Invitrogen[™]
- **TAE Rotiphorese[®] 50x TAE Puffer**, Carl Roth GmbH + Co. KG
- **Trichlormethan/Chloroform** $\geq 99 \%$, DAB, BP, reinst, Carl Roth GmbH + Co.KG
- **TRI-Reagent[®] LS**, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- **Tris-Hydrochlorid Pufferan[®]** $\geq 99 \%$, p.a., Roth GmbH + Co.KG
- **Tween[®] 80**, Protein Grade[®] Detergent, 10 % Solution, sterile-filtered, Merck KGaA

3.2 Nährmedien

- **DSMZ Medium 1: Nutrient Agar**, pH 7,0

Pepton	5,0 g
Fleischextrakt	3,0 g
Agar, wenn nötig	15,0 g
Destilliertes Wasser	auffüllen auf 1000,0 ml

- **DSMZ Medium 11: MRS Medium**, pH 6,35

Caseinpepton, tryptisch verdaut	10,00 g
Fleischextrakt	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g

Glucose	20,00 g
Tween 80	1,00 g
K ₂ HPO ₄	2,00 g
Natriumacetat	5,00 g
(NH ₄) ₂ Citrat	2,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,20 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,05 g
Destilliertes Wasser	auffüllen auf 1000,00 ml

- CMC Medium

Carboxymethylcellulose	0,5 g
NaNO ₃	0,1 g
K ₂ HPO ₄	0,1 g
KCl	0,1 g
MgSO ₄	0,05 g
Hefeextrakt	0,05 g
Glucose	0,1 g
Destilliertes Wasser	auffüllen auf 100,0 ml

3.3 Mikroorganismen

Alle Mikroorganismen wurden vom Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogen.

- DSM Nr. **10**: *Bacillus subtilis*, Stamm Marburg
- DSM Nr. **65**: *Paracoccus pantotrophus*, Stamm 381
- DSM Nr. **498**: *Escherichia coli* (*E. coli*), Stamm K12 Wildtyp
- DSM Nr. **3580**: *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis*
- DSM Nr. **6147**: *Pseudomonas fluorescens*
- DSM Nr. **15444**: *Ralstonia eutropha*, Stamm HF39
- DSM Nr. **20107**: *Cellulomonas uda*, Stamm 136
- DSM Nr. **20174**: *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*, Stamm Lp 39
- DSM Nr. **30205**: *Rhizobium radiobacter*, Stamm B 6

3.4 Molekularbiologische Reagenzien

- **DNA-Standard** Quick-Load 1 kb DNA Ladder 50 µg/ml, New England BioLabs
- **DNA-Standard** Quick-Load 100 bp DNA Ladder 50 µg/ml, New England BioLabs
- ***E. coli*-Standard** *E. coli* Total RNA 1 mg/ml, Ambion[®] by life technologies[™]
- **Glass beads**, acid-washed, Sigma-Aldrich Chemie GmbH

- **GoTaq[®] Green Master Mix 2x**, Promega Corporation
- **HindIII-HF 2x** mit **Puffer 4**, New England BioLabs

5'... A A G C T T ... 3'
 3'... T T C G A A ... 5'
- **iTaq[™] Universal SYBR[®] Green SuperMix**, Bio-Rad Laboratories GmbH
- **Primer UniBac27f-FAM** (forward) 100 µM, biomers.net the biopolymer factory
5'-gag ttt gat cmt ggy tca g-3'
- **Primer Univ1492r** (reverse) 100 µM, biomers.net the biopolymer factory
5'-tac ggy tac ctt gtt acg act t-3'
- **Primer mlas** (forward) 100 µM, biomers.net the biopolymer factory
5'-ggg ggt gtm ggd ttc acm car ta-3'
- **Primer mcrA-rev** (reverse) 100 µM, biomers.net the biopolymer factory
5'-cgt tca tbg cgt agt tvg grt agt-3'
- **Proteinase K** Solution 20 mg/ml, Ambion[®] by life technologies[™]
- **RNAprotect Bacteria Reagent**, Qiagen
- **RNAsecure[™] Reagent 25x**, Ambion[®] by life technologies[™]

3.5 Material

- Probe aus dem Fermenter der Biogasanlage der Agrargenossenschaft Hainichen – Pappendorf e.G. (*wird in der Arbeit kurz als Biogasprobe bezeichnet*)
- **GeneJET[™] GelExtraction Kit**, Thermo Scientific

Binding Buffer
 Wash Buffer (konzentriert)
 Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)
 GeneJET Purification Columns
- **High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit**, Applied Biosystems

10X RT Buffer
 10X RT Random Primers
 25X dNTP Mix (100 mM)
 MultiScribe[™] Reverse Transcriptase, 50 U/µL
 RNase Inhibitor, 20 U/µl
- **MasterPure[™] RNA Purification Kit**, Epicentre Biotechnologies

Red Cell Lysis Solution
 Tissue and Cell Lysis Solution
 2X T and C Lysis Solution

MPC Protein Precipitation Reagent
RNase-Free DNase I, 1 U/ μ l
Proteinase K, 50 mg/ml
RiboGuard™ RNase Inhibitor, 40 U/ μ l
1X DNase Buffer
TE Buffer

- **MMLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis Kit**, Epicentre
Biotechnologies

MMLV Reverse Transcriptase, 50 U/ μ l
MMLV RT 10X Reaction Buffer
RiboGuard™ RNase Inhibitor, 40 U/ μ l
100 mM Dithiothreitol (DDT)
dNTP PreMix (5 mM jedes dNTPs)
Oligo(dT)21 Primer, 10 μ M
Random Nonamer Primer, 50 μ M
RNase-freies Wasser

- **RNA 6000 Nano Kit**, Agilent Technologies

30 Safe-Lock Eppendorf Tubes PCR clean (DNase-/RNase-frei)
1 Spritzvorrichtung
4 Spin-Filter

Agilent RNA 6000 Nano Chips:
25 RNA Nano Chips
2 Elektroden-Cleaner

Agilent RNA 6000 Nano Reagents:
Agilent RNA 6000 Ladder
RNA Nano Dye Concentrate
Agilent RNA 6000 Nano Marker
Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix

- **RNeasy Mini Kit**, QIAGEN

RNeasy Mini Spin Columns (pink)
Collection Tubes (1.5 ml)
Collection Tubes (2 ml)*
Buffer RLT
Buffer RW1
Buffer RPE (concentrate)
RNase-Free Water

- **TURBO DNA-free™ Kit**, Ambion® by life technologies™

TURBO DNase (2 U/ μ L)
10X TURBO DNase Buffer

DNase Inactivation Reagent
Nuclease-free Water

3.6 Geräte

- 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies
- Analysewaage BP61S, Sartorius
- Centrifuge 5702 R, Eppendorf
- Elektrophoresis Power Supply PS 304 minipac II, Apelex
- Gelelektrophoresekammer Mini-Sub[®] Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH
- GrillMikrowelle LUNIK 900G
- Heraeus Inkubator, Thermo Scientific mit
Schüttelgerät Rotamax 120 mit Spannwalzenaufsatz mit zwei Spannwalzen,
Heidolph Instruments
- Kreisschüttler MS3, IKA[®]
- Mikrowelle intellowave, LG
- MJ Mini[™] Personal Thermal Cycler mit MiniOpticon[™] Real-Time PCR System,
Bio-Rad Laboratories GmbH
- Schüttelinkubator GFL 30-32
- Sonoplus Homogenisator HD2200, Bandelin
- Spektralphotometer DR 3800 VIS, Hach-Lange
- Spektrophotometer NanoVue[™], General Electric
- Thermoblock HTML-133, HLC
- Thermoblock Type QBD1, Grant Instruments
- Thermocycler TC-PLUS, Techne
- Thermocycler Prime, Techne (Leihgerät der Firma biostep)
- Thermomixer comfort, Eppendorf
- Transilluminator BT-0303-0088, LTE mit
Kamera C-5060, Olympus mit
SybrSafe Filter, Biostep
- Vortex-Genie[®]2, Scientific Industries
- Zentrifuge MiniSpinPlus, Eppendorf
- Zentrifuge MiniStar silverline, VWR[®]

4 Methoden

In diesem Kapitel werde ich die von mir im Rahmen meiner Masterarbeit erlernten und durchgeführten Methoden beschreiben.

4.1 Herstellen der Reagenzien und Präparieren der Geräte

Alle für die Arbeit mit RNA verwendeten Lösungen wurden mit nukleasefreiem Wasser hergestellt. Hierfür wurde 0,05 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) [Farrell, 2010: S. 163] zu destilliertem Wasser gegeben, 45 min gerührt und anschließend autoklaviert, wodurch das DEPC vollständig zu Kohlenstoffdioxid und Ethanol zerfällt. „Durch DEPC werden primäre und sekundäre Amine, wie beispielsweise Histidin, kovalent gebunden. Dadurch wird die Aktivität von RNasen, aber auch die aller anderen Enzyme, zerstört [Mülhardt, 2009 : S.117].

Alle Chemikalien wurden ausschließlich für die RNA-Arbeit verwendet. Der gesamte Arbeitsplatz, die Pipetten und alle Geräte wurden täglich mit RNase AWAY gereinigt.

4.2 Versuch 1: verschiedene Methoden der RNA-Extraktion aus *Escherichia coli*

An dieser Stelle wurden fünf unterschiedliche Methoden der Nukleinsäureextraktion aus *E. coli* durchgeführt. Diverse Methoden für die Transkriptomanalytik sollen nachfolgend an dem Modellorganismus *E. coli* etabliert werden. Für diesen Zweck ist es nötig, zunächst zu überprüfen, welche Extraktionsmethode für diesen Organismus die besten Ergebnisse bezüglich der extrahierten RNA liefert. Alle Extraktionen wurden in 6fach Ansätzen durchgeführt.

4.2.1 Zellwachstum und Zellernte

Als Ausgangsmaterial diente für jede Extraktion eine über Nacht, bei 37 °C und in DSMZ Medium 1 kultivierte *E. coli* – Batchkultur. Geerntet wurden die Zellen während ihrer exponentiellen Wachstumsphase, indem je 1 ml Kultur entnommen wurde und die Zellen durch 5 min zentrifugieren bei 3000 x g pelletiert wurden.

4.2.2 Zellyse

4.2.2.1 TRI: TRI Reagent LS und Ultraschall (chemische und mechanische Lyse)

Das Zellpellet wurde in 400 µl 0,9 % (w/v) Natriumchlorid-Lösung resuspendiert und 1200 µl TRI Reagent LS wurden zugegeben. Die Ultraschall-Lyse erfolgte anschließend

für 60 s mit einer Amplitude von 310 μm . Die Einwirkzeit des Ultraschalls auf die Probe betrug 0,5 s, gefolgt von 0,5 s Pause.

4.2.2.2 BB: Bead Beating (mechanische Lyse)

Die Resuspendierung des Zellpellets erfolgte mittels 1000 μl 4 M Guanidinthiocyanat und anschließendem 10 s vortexen. Die gesamte Lösung wurde in ein Reaktionsgefäß mit circa 100 mg säuregewaschenen Glaskugeln überführt und es wurden 25 μl 20 % Sarcosyl zugegeben. Die Lösung wurde durch 5 min vortexen homogenisiert.

4.2.2.3 EP: Extraktionspuffer und Proteinase K (enzymatische Lyse)

Das Pellet wurde mittels 1000 μl Extraktionspuffer (4 °C), 12,5 μl Proteinase K und 25 μl 20 % Sarcosyl durch 10 s vortexen resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 65 °C für 15 min und anschließendes vortexen für 1 min.

4.2.2.4 GTC: Guanidinthiocyanat (chemische Lyse)

Es wurden 1000 μl Guanidinthiocyanat (4 °C) und 25 μl 20 % Sarcosyl zum Zellpellet gegeben und dieses durch 10 s vortexen resuspendiert. Die Lyse erfolgte während einer 15 min Inkubation bei 65 °C und abschließend 1 min vortexen.

4.2.2.5 MP: MasterPure™ RNA Purification Kit (Salzfällung der Proteine)

1 μl Proteinase wurden in 300 μl Tissue and Cell Lysis Solution gelöst und das Zellpellet in 300 μl dieser Lösung resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte während einer 15 min Inkubation bei 65 °C mit zwischenzeitlichem Vortexen aller 5 min. Anschließend wurde weitere 5 min auf dem Kühlblock (0 °C) inkubiert [URL-5].

4.2.3 Abtrennung der Proteine

4.2.3.1 Methoden TRI, BB, EP, GTC

Das Entfernen der Proteine verlief bei den Methoden TRI, BB, EP und GTC analog. Hierfür erfolgte die Zugabe von 800 μl 24:1 Chloroform-Isoamylalkohol (Methode TRI: 320 μl Chloroform) und 5 min vortexen. Anschließend wurde 10 min bei 14100 x g zentrifugiert, wobei es zur Ausbildung einer organischen Phase (Chloroform-Isoamylalkohol), einer Interphase (Proteine, Zellbruchstücke) und einer wässrigen Phase (enthält Nukleinsäuren) kam. Die wässrige Phase wurde, ohne die Interphase zu berühren, abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Erneut wurden 800 μl 24:1 Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben, 5 min gevortext und 10 min bei

14100 x g zentrifugiert. Wieder wurde die wässrige Phase abgenommen und für die Ausfällung der Nukleinsäuren in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.2.3.2 Methode MP

Zur lysierten Probe wurden 200 µl MPC Protein Precipitation Reagent zugegeben und im Anschluss 10 s gevortext. Die Proteine, Bruchstücke und Zelltrümmer wurden durch 10 min zentrifugieren bei 14100 x g pelletiert und der Überstand wurde ohne dieses Pellet zu berühren in ein neues Tube überführt [URL-5].

4.2.4 Ausfällung der gesamten Nukleinsäuren

Hierfür wurden 250 µl 3 M Natriumacetat und 1000 µl Isopropanol (-20 °C) (Methode MP: 500 µl Isopropanol und kein Natriumacetat) zugegeben und das Reaktionsgefäß wurde 40 mal invertiert. Die Nukleinsäuren wurden durch 15 min zentrifugieren bei 14100 x g pelletiert. Anschließend wurde das Isopropanol vollständig abpipettiert und es folgte ein Waschschriff mit Ethanol. Hierfür wurden 500 µl 80 % Ethanol (-20 °C) zur Probe gegeben, kurz gevortext und 10 min bei 14100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und das Pellet in offenem Tube mit einem Tuch abgedeckt trocknen gelassen bis es klar war. Das Nukleinsäurepellet wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst. Wurden die Proben nicht sofort weiter verarbeitet und sollten gelagert werden (-20 °C bzw. bei einer längeren Aufbewahrung -86 °C), wurde zu den Proben RNasecure in 1facher Endkonzentration gegeben, gut durchmischt und es folgte eine 10 min Inkubation bei 60 °C, um eventuell in der Probe vorhandene RNasen zu deaktivieren und einen Abbau der RNA zu vermeiden. Wurde die Probe später aufgetaut, erfolgte nochmals eine 10 min Inkubation bei 60 °C [URL-6].

4.2.5 Entfernen der DNA

Nach der Nukleinsäureextraktion wurde mit Hilfe des *Rigorous DNase treatment*-Protokolls des TURBO DNA-freeTM Kits mit einem Teil der Proben ein DNase-Verdau durchgeführt. Dabei wurden 0,1 Volumen DNase Puffer und 1 µl DNase zur Probe gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurde nochmals 1 µl DNase zugegeben und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 0,2 Volumen (jedoch stets mindestens 2 µl) DNase Inactivation Reagent zugegeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und das Gemisch zwischenzeitlich mehrmals angeschnippt.

Es wurde 90 s bei 14100 x g zentrifugiert und der Überstand, welcher die RNA enthielt, in ein sauberes Tube überführt [URL-7].

4.2.6 Überprüfen der RNA-Quantität und -Qualität

Die Quantität der RNA wurde für die DNase-verdauten 6-fach Ansätze der jeweiligen Extraktionsmethoden mit Hilfe des NanoVue™ Spektrophotometers und dessen Standardprogramm für die Konzentrationsmessung von RNA bestimmt. Das Ergebnis wurde anschließend in einem, mit dem Programm RStudio [URL-8] erstellten, Boxplot dargestellt. Desweiteren wurde mit diesem Programm ein paarweiser t-Test durchgeführt, um den Unterschied der Methoden auf Signifikanz zu prüfen.

Anschließend wurden die Proben, einerseits jene die noch DNA enthielten, andererseits jene nach dem DNase-Verdau, innerhalb der verschiedenen Extraktionsmethoden gepoolt, sodass für die anschließende Überprüfung der RNA-Qualität mittels Urea-Gelelektrophorese zu jeder Methode eine Probe mit den gesamten extrahierten Nukleinsäuren und eine Probe mit ausschließlich RNA vorlag.

Bei der Urea-Gelelektrophorese wurden Proben die RNA enthielten mit 4 M Urea denaturiert, bevor sie auf ein Agarosegel aufgetragen wurden. Urea und anschließendes Erhitzen sorgten dafür, dass alle intermolekularen und intramolekularen Interaktionen der RNA gelöst werden konnten. Dies war notwendig, da Sekundärstrukturen der RNA, RNA-Haarnadel-Strukturen oder ähnliches die Wanderung der RNA im Gel verändern. Das Resultat der Elektrophorese wären somit keine eindeutigen Banden, sondern ein Schmier [Farrell, 2010: S. 178/186].

Für die Gelelektrophorese wurde mittels 1 x TAE-Puffer und SybrSafe (in der Enkonzentration 1 x) ein 1,2 % nicht-denaturierendes Agarosegel hergestellt. Zu 10 µl RNA-Probe wurde 1 µl 4 M Urea zugegeben und die Probe 10 min bei 65 °C und anschließend 2 min auf dem Kühlblock (0 °C) inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des 11 x Ladungspuffers Orange G in 1 x Endkonzentration und die gesamte Probe konnte auf das Gel aufgetragen werden [Farrell, 2010 : S. 191]. Wurde als Standard die gekaufte *E. coli* Total RNA mitgeführt, wurden zu 2 µl *E. coli* Total RNA 0,5 µl 4 M Urea gegeben, das Gemisch wurde ebenfalls für 10 min bei 65 °C und 2 min auf dem Kühlblock inkubiert und anschließend mit 0,5 µl Ladungspuffer versehen. Die Gelelektrophorese lief 43 min bei 100 V. Das Ergebnis wurde anschließend unter dem Transilluminator bei 100 % UV-Licht sichtbar gemacht.

4.3 Implementierung einer RT-PCR und PCR für die 16S rRNA von *E. coli*

Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Versuche war es, die 16S rRNA von *E. coli* mittels RT-PCR in cDNA umzuschreiben und anschließend mit Hilfe einer PCR zu vervielfältigen.

4.3.1 verwendete Primer und deren Analyse

Um die 16S rRNA zu amplifizieren, wurden die genspezifischen Primer UniBac27f-FAM und Univ1492r (Kurzbezeichnung UniBac und Univ) verwendet [Kleinstauber, 2013]. Der forward-Primer UniBac besitzt die Sequenz 5'-gag ttt gat cmt ggy tca g-3' (19 nt) und der reverse-Primer Univ die Sequenz 5'-tac ggy tac ctt gtt acg act t-3' (22 nt). Um spätere Ergebnisse der folgenden Versuche beurteilen zu können, ist es zunächst nötig, diese Primer in Hinblick auf ihr zu erwartendes Amplifikat näher zu untersuchen. Zur Analyse wurde das Genom von *Escherichia coli str. K12 substr. MG1655* (NC_000913) verwendet. Die 16S rRNA ist in *E. coli* sieben mal codiert und ihre Länge beträgt 1542 nt. Diese Informationen wurden aus dem unter [URL-9] abgerufenen Sequenzformat extrahiert. Die beiden Primer wurden mit dem Programm Primer-BLAST [URL-10] in der nr-Datenbank und unter Standardeinstellungen gegen das Gesamtgenom von *E. coli* und das Genom des *Homo sapiens* geblastet.

4.3.2 Versuch 2: RT-PCR mit genspezifischen Primern

Als Ausgangsmaterial diente wieder eine, bei 37 °C in DSMZ Medium 1 kultivierte, *E. coli*-Übernachtskultur. Im Doppelansatz (A/B) erfolgte eine RNA-Extraktion mit dem MasterPure™ RNA Purification Kit (siehe 4.2). Die getrockneten Pellets wurden in 50 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Konzentrationsmessung der gesamten Nukleinsäuren mit dem Spektrophotometer ergab für Ansatz A 4850 ng/µl, für Ansatz B 2983 ng/µl. Mit dem TURBO DNA-free™ Kit können maximal 50 ng DNA/µl Probe entfernt werden [URL-7] und auch für die später durchzuführende cDNA-Synthese dürfen maximal 2 µg total RNA in die Reaktion eingesetzt werden [URL-11]. Um diese Angaben später nicht zu überschreiten, wurden von den Ansätzen A und B je 1:100-Verdünnungen hergestellt.

Anschließend wurde der DNase-Verdau mit 50 µl der Verdünnungen mit dem TURBO DNA-free™ Kit durchgeführt. Aufgrund der nun niedrigen Konzentrationen wurde das

Routine DNase treatment-Protokoll angewandt. Hierfür wurde 0,1 Volumen DNase Puffer zur Probe pipettiert. Die Zugabe von 1 µl DNase und die anschließende 30 min Inkubation bei 37 °C erfolgten bei diesem Protokoll nur einmalig. Danach war die Zugabe von 0,1 Volumen DNase Inactivation Reagent ausreichend. Die 5 min Inkubation bei Raumtemperatur mit zwischenzeitlichem Anschnippen und eine 90 s Zentrifugation bei 14100 x g sowie das Überführen des Überstandes in ein neues Tube erfolgte analog dem unter 4.2.5 aufgeführten *Rigorous DNase treatment*-Protokoll [URL-7].

Danach wurden die Proben mittels des RNeasy Mini Kits nach dem RNA Cleanup-Protokoll aufgereinigt. Dieses System bindet RNA, die länger als 200 Basen ist, an eine spezielle Membran und erlaubt es kontaminierende Bruchstücke auszuwaschen. Die maximale Bindungskapazität der Silicamembran beträgt dabei 100 µg [URL-12: S.10]. Zu Beginn wurde jede Probe mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Es wurden 350 µl RLT-Puffer zugegeben und gevortext. Im Anschluss folgte die Zugabe von 250 µl Ethanol (-20 °C) und das Mischen durch pipettieren. Die komplette Probe wurde umgehend in eine RNeasy Mini Spin-Säule überführt, es folgte für 15 s eine Zentrifugation bei 10000 x g. Der Durchfluss wurde verworfen und zum Waschen der Membran wurden 500 µl RPE-Puffer in die Säule gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation von 15 s bei 10000 x g wurde der Durchfluss wieder verworfen und es wurden erneut 500 µl RPE-Puffer zugegeben. Die Probe wurde 2 min bei 10000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die RNeasy Mini Spin-Säule in ein frisches 2 ml-Tube platziert und für 1 min bei 14100 x g zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Tube gesetzt und 30 µl RNase-freies Wasser wurden direkt auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Probe 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Dieser letzte Eluierungsschritt wurde mit zusätzlichen 30 µl RNase-freiem Wasser und einer weiteren 1 min Zentrifugation bei 10000 x g wiederholt [URL-12: S.56-57].

Eine erneute Konzentrationsmessung des RNA-Gehaltes mit dem Spektrophotometer ergab für Ansatz A 19 ng total RNA/µl und für Ansatz B 22 ng total RNA/µl.

Die Erststrangsynthese der cDNA wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription (RT) Kit durchgeführt [URL-11]. Jedoch wurden anstelle der mitgelieferten Random Primer die, für die 16S rRNA genspezifischen, Primer UniBac

und Univ verwendet. Zunächst wurde daher nach dem Schema für die Reaktion mit genspezifischen Primern ein Master Mix für so viele Reaktionen wie nötig hergestellt. Tabelle 2 zeigt das Pipettierschema sowohl für die Reaktion mit genspezifischen, als auch für die Reaktion mit Random Primern. Alle Pipettierschritte in diesem Protokoll wurden auf dem Kühlblock durchgeführt.

Tabelle 2: Pipettierschema für den 2 x RT Master Mix des High Capacity cDNA RT Kits

Reagent	Volumen/Reaktion [µl]	
	Verwendung genspezifischer Primer	Verwendung Random Primer
RT Buffer	2,0	2,0
dNTP Mix	0,8	0,8
UniBac, 10 µM bzw. mlas, 10 µM	1,0	-
Univ, 10 µM bzw. mcrA-rev, 10 µM	1,0	-
Random Primer	-	2,0
Reverse Transkriptase	1,0	1,0
RNase-Inhibitor	1,0	1,0
DEPC-Wasser auffüllenn auf	10,0	10,0

In diesem Versuch wurden für Ansatz *A* und *B* jeweils zwei Reaktionen mit Reverse Transkriptase (Probennummerierung: *A/B* +*RT*) und zwei Reaktionen ohne Reverse Transkriptase (Probennummerierung: *A/B* -*RT*), sowie ein Ansatz für die No Template (NT)-Kontrolle (Probennummerierung: *NT*) benötigt. In vorbereitete Tubes wurden je 10 µl des zugehörigen 2 x RT Master Mixes pipettiert, anschließend wurden 10 µl total RNA aus Ansatz *A* bzw. aus Ansatz *B* entsprechend hinzugegeben. Dies entspricht einem Mengeneinsatz von 190 ng (*A* +/-*RT*) bzw. 220 ng (*B* +/-*RT*) total RNA pro 20 µl Gesamtreaktionsvolumen. Zur NT-Kontrolle wurden 10 µl DEPC-Wasser pipettiert. Alle Reaktionen wurden gut durchmischt und anschließend herunter zentrifugiert, bevor sie in den Thermocycler platziert wurden. Dieser heizte zunächst auf 50 °C vor, bevor das in Abbildung 10 dargestellte Programm durchlaufen wurde. Durch 10 min bei 65 °C sollte eine initiale Denaturierung, das heißt die Auflösung aller Sekundärstrukturelemente der RNA, erreicht werden. Das Annealing erfolgte 10 min bei 25 °C, die Extension 120 min bei 37 °C und der Abbruch der Reaktion durch ein

5 min erhitzen auf 85 °C. Nach Beendigung der Reaktion hält der Thermocycler die Temperatur bei 4 °C [nach URL-11].

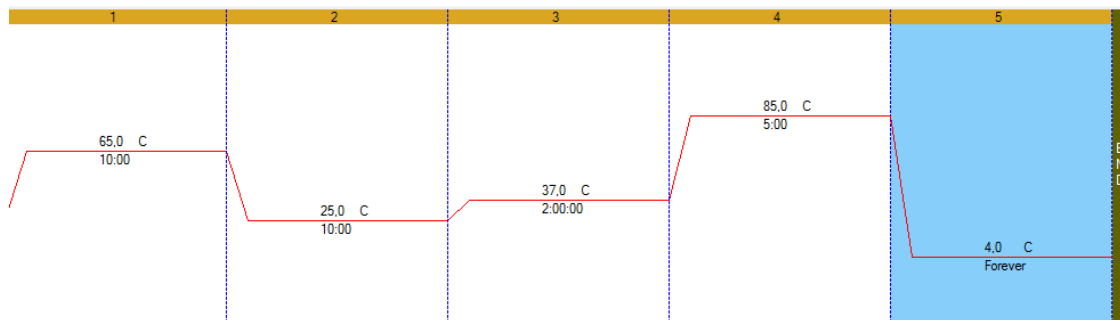


Abbildung 10: RT-PCR-Programm [erstellt mit CFX Manager™ Software Version 3.0 von Bio-Rad]
Bei 65 °C wurde die RNA 10 min denaturiert, das Annealing erfolgte 10 min bei 25 °C, die Elongation 2 h bei 37 °C, der Abbruch der Reaktion 5 min bei 85 °C. Anschließend wird eine Temperatur von 4 °C gehalten.

Nachfolgend sollte die synthetisierte cDNA mittels einer Standard-PCR vervielfältigt werden. Auch diese PCR-Ansätze wurden die gesamte Zeit auf dem Kühlblock pipettiert. Zunächst wurde für alle benötigten Reaktionsansätze ein PCR Master Mix, bestehend aus GoTaq Green MasterMix, den Primern UniBac und Univ sowie, wenn nötig, nukleasefreiem Wasser, nach dem in Tabelle 3 dargestellten Schema hergestellt.

Tabelle 3: Pipettierschema für den Master Mix der PCR

Reagent	Volumen/Reaktion [µl]
GoTaq Green Master Mix	12,5
UniBac (10 µM)	0,5
Univ (10 µM)	0,5
DNA-Template	x
DEPC-Wasser auffüllen auf	25

Für die Ansätze *A/B +/-RT* und *NT* wurden 11,5 µl der entsprechenden RT-PCR-Proben zugegeben. Desweiteren wurden auch je zwei PCR-Ansatz mit den 1:100 verdünnten Extraktionsproben *A* und *B* vor dem DNase-Verdau durchgeführt (Probennummerierung: *A/B +DNA*). Hierfür wurden 5 µl Probe *A* bzw. 8,5 µl Probe *B* zum Master Mix pipettiert. Dies entspricht einem Einsatz von circa 250 ng Nukleinsäuren. Die Reaktionsgemische wurden gut durchmischt, herunter zentrifugiert und in den Thermocycler platziert [URL-13]. Dieser durchlief das folgende Programm (vergleiche Abbildung 11): 3 min 95 °C als initiale Denaturierung, gefolgt von fünf

initialen Zyklen bestehend aus einer Denaturierung bei 95 °C für 30 s, einem Annealingschritt bei 48 °C für 45 s und der Extension bei 72 °C für 30 s. Der Temperaturanstieg vom Annealing zur Extension betrug 0,1 °C/s. Weiterhin schlossen sich 30 Zyklen, bestehend aus der Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 55 °C für 45 s und Elongation bei 72 °C für 30 s, an. Die finale Elongation fand 10 min bei 72 °C statt [Steinberg & Regan, 2008: S.6664], gefolgt von einer Wahrung der Proben bei 4 °C nach Beendigung des Programmes.

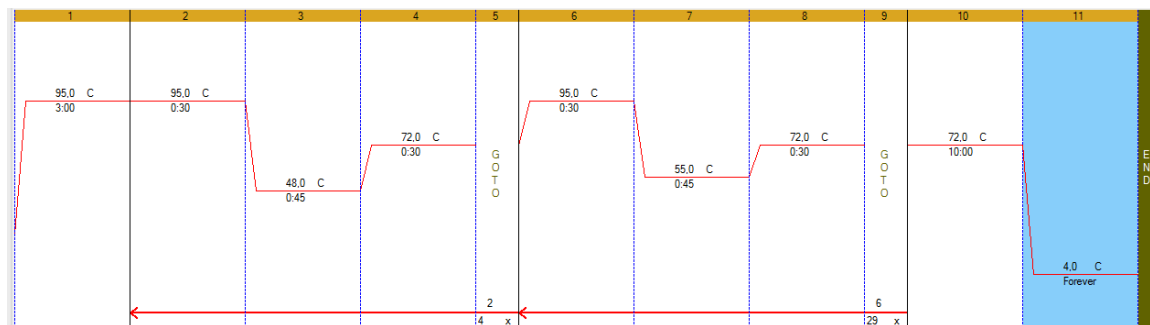


Abbildung 11: PCR-Programm [erstellt mit CFX Manager™ Software Version 3.0 von Bio-Rad]
Der Thermocycler durchlief nach der initialen 3 min Denaturierung bei 95 °C fünf initiale Zyklen, bestehend aus Denaturierung 30 s bei 95 °C, Annealing 45 s bei 48 °C und Extension 30 s bei 72 °C. Es schlossen sich 30 weitere Zyklen mit der Denaturierung 30 s bei 95 °C, Annealing 45 s bei 55 °C und Extension 30 s bei 72 °C an. Nach der finalen 10 min Elongation bei 72 °C wurden die Proben bei 4 °C gewahrt.

Abschließend wurden 20 µl der RT-PCR- und der PCR-Proben auf ein 1,2 % Agarosegel aufgetragen. Von den RT-PCR-Proben A +/-RT wurde aus Platzgründen nur je ein Ansatz auf das Gel aufgetragen. Zu den cDNA-Proben wurden je 4 µl 5x Ladungspuffer xylen cyanol loading dye gegeben. 20 µl der PCR-Proben konnten direkt auf das Gel aufgetragen werden, da der GoTaq Green Master Mix bereits für die nötige Dichte und Sichtbarkeit der Wanderung im Gel sorgt [URL-13]. Desweiteren wurden 10 µl 1 kb DNA-Standard aufgetragen. Die Laufzeit betrug 45 min bei 100 V.

4.3.3 Versuch 3: RT-PCR mit Random Primern

In diesem Experiment wurden für die RT-PCR anstelle der genspezifischen Primer die im Kit enthaltenen Random Primer verwendet. Ausgangsmaterial für den Versuch war übrig gebliebenes und bei -20 °C gelagertes Probenmaterial der 1:100-Verdünnungen der Ansätze A und B aus Versuch 1. Mit je 50 µl beider Ansätze wurde der DNase-Verdau und das anschließende RNA Cleanup, wie unter 4.3.2 aufgeführt, durchgeführt.

Die anschließende Konzentrationsmessung mit dem Spektrophotometer ergab für Ansatz A 12 ng/µl und für Ansatz B 16 ng/µl.

Für die folgende RT-PCR wurden in diesem Versuch für Ansatz A und B jeweils zwei Reaktionen mit Reverse Transkriptase (Probennummerierung: A/B +RT) und zwei Reaktionen ohne Reverse Transkriptase (Probennummerierung: A/B -RT), je eine Reaktion ohne Primer als Negativkontrolle (Probennummerierung: A/B neg) sowie ein Ansatz ohne Probe (Probennummerierung: NT) benötigt. Für diese Reaktionen wurden Master Mixe entsprechend nach dem in Tabelle 2 aufgeführten Schema hergestellt. Die weitere Durchführung erfolgte wie in 4.3.2 beschrieben. Der Mengeneinsatz totaler RNA pro 20 µl Gesamtreaktion betrug 120 ng (A +RT/-RT/neg) bzw. 160 ng (B +RT/-RT/neg).

Die anschließende PCR erfolgte analog dem entsprechenden Abschnitt unter 4.3.2. Für die Reaktionsansätze ohne Primer wurde das fehlende Volumen mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Als DNA-Template wurden bei allen Reaktionen 5 µl der jeweiligen RT-PCR-Probe eingesetzt.

Das Ergebnis des Versuches wurde anschließend auf zwei 1,2% Agarosegelen sichtbar gemacht. Aufgetragen wurden 15 µl RT-PCR-Proben mit je 1,4 µl 11x Ladungspuffer Orange G, 5 µl der PCR-Proben, 10 µl 1 kb DNA-Standard sowie *E. coli*-Standard (siehe 4.2.6). Die Gelelektrophorese lief bei 100 V 45 min bei Gel 1 bzw. 40 min bei Gel 2.

4.3.4 Versuch 4: Einsatz einer größeren RNA-Menge in der RT-PCR

Aus einer in DSMZ Medium 1 und bei 37 °C kultivierten *E. coli*-Übernachtskultur wurde mit dem MasterPureTM RNA Purification Kit (siehe 4.2) im Doppelansatz RNA extrahiert. Das Pellet wurde anschließend in nur 35 µl TE-Puffer gelöst und von den Ansätzen A und B wurden je 20 µl für den DNase-Verdau nach dem *Rigorous DNase treatment*-Protokoll (4.2.5) verwendet. Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit dem unter 4.3.2 beschriebenen RNA Cleanup-Protokoll.

Natürlich ist für Transkriptionsanalysen auch die RNA-Qualität von entscheidender Bedeutung [Farrell, 2009]. Um auszuschließen, dass das Nichtgelingen der cDNA-Synthese durch eine schlechte RNA-Qualität verursacht wurde, wurde diese an der Stelle mit Hilfe des 2100 Bioanalyzers überprüft. Der Bioanalyzer bietet die Möglichkeit einer standardisierte Qualitätskontrolle von RNA unter Einsatz einer sehr

geringen Probenmenge. Die RNA-Proben werden auf einem RNA Nano Chip elektrophoretisch aufgetrennt und mittels laserinduzierter Fluoreszenzdetektion gemessen [Fleige & Pfaffl, 2006 : S.130].

Die Kitkomponenten wurden lichtgeschützt bei 4 °C gelagert und etwa 30 min vor Gebrauch auf Raumtemperatur temperiert. Vor jeder Nutzung des Bioanalyzers mussten dessen Elektroden gereinigt werden, indem ein Elektrodenreinigerchip mit circa 350 µl ElectroZap gefüllt und für 1 min in den Bioanalyzer platziert wurde. Im Anschluss wurde ein zweiter Elektrodenreinigerchip mit 350 µl DEPC-Wasser befüllt und für 10 s zum Spülen der Elektroden in den Bioanalyzer gelegt. Zum Verdunsten des Wassers verlief der Bioanalyzer 10 s offen, bevor der Analysechip in ihn platziert werden konnte. Dieser Analysechip wurde wie folgt beladen. 550 µl Gelmatrix wurden in einen Spin-Filter pipettiert und 10 min bei 1500 x g zentrifugiert. Diese Gelmatrix wurde zu je 65 µl aliquotiert und konnte vier Wochen verwendet werden. Das Nano Farbkonzentrat wurde für 10 s gevortext und herunter zentrifugiert. 1 µl dieses Farbkonzentrats wurde zu 65 µl aliquotiertem, filtrierten Gel gegeben. Diese Lösung wurde gut gevortext, bevor sie 10 min bei 13000 x g zentrifugiert wurde. Dieser Gel-Farb-Mix muss innerhalb eines Tages aufgebraucht werden. Der Chip wurde, an die in Abbildung 12 mit einem grünen Pfeil markierte Stelle, in die Befüllstation gelegt und dort beladen. Zum besseren Verständnis sind in Abbildung 12 ein solcher RNA Nano Chip und die Befüllstation dargestellt. Um Luftblasen zu vermeiden, war beim Befüllen des Chips stets darauf zu achten, dass revers pipettiert und die Pipettenspitze schräg auf den Boden der Wells aufgesetzt wurde. Zunächst erfolgte die Zugabe von 9 µl Gel-Farb-Mix in das mit einem dicken *G* markierte Well. Die Spritze musste auf 1 ml aufgezogen sein bevor die Füllstation mit dem darin befindlichen Chip geschlossen werden konnte. Der Kolben wurde herunter gedrückt bis er einrastete (siehe rote Markierung in Abbildung 12) und nach exakt 30 s wieder gelöst (siehe blaue Markierung in Abbildung 12). Nach 5 s konnte der Kolben wieder in die 1 ml-Position zurück gebracht werden. Die Befüllstation wurde geöffnet und je 9 µl Gel-Farb-Mix wurden in die anderen zwei mit *G* markierten Wells pipettiert. Im Anschluss wurden in alle 12 Proben-Wells und in das mit einer *Leiter* markierte Well je 5 µl Marker gegeben. In das mit der *Leiter* versehene Well wurde desweiteren 1 µl RNA-Ladder zugegeben. Um Sekundärstrukturen zu minimieren wurden die Proben 2 min bei 65 °C denaturiert,

bevor 1 μl Probe in je ein Well pipettiert wurde. In jedes unbenutzte Well wurde 1 μl Marker gegeben. Als der Chip fertig beladen war, folgte ein 1 min Vortexen bei 2400 rpm auf dem Kreisschüttler. Anschließend konnte der Chip in den Bioanalytiker platziert und dieser mit der Prokaryote Total RNA Nano-Methode unter Standardeinstellungen gestartet werden [URL-14].



Abbildung 12: Ein RNA Nano Chip und die Befüllstation für eine RNA-Analyse mittels Bioanalytiker

Im Anschluss an die Qualitätsüberprüfung wurde mit der Probe A weitergearbeitet. Die RT-PCR wurde wie unter 4.3.2 beschrieben durchgeführt. Für diesen Versuch wurden mit der Probe A sowohl Reaktionsansätze mit den Random Primern, als auch mit den 16S rRNA-Primern UniBac und Univ durchgeführt. Zusätzlich wurde mit jedem Primerpaar eine Positivkontrolle (*pos*) mitgeführt, bei welcher zu dem Master Mix *E. coli*-Standard gegeben wurde. Desweiteren wurde jedes Primerpaar ohne Template (*NT*) bzw. ohne Reverse Transkriptase (*-RT*) getestet und auch eine Negativkontrolle (*neg*) ohne Primer wurde wieder mitgeführt. Die Tabelle 4 liefert eine Übersicht über die verwendete *Probennummerierung* und den Inhalt des jeweiligen Reaktionsansatzes. Zu 10 μl Master Mix wurden entsprechend 5,5 μl Probe A (1, 2, 4, 5, 7-9) bzw. 2 μl *E. coli*-Standard (3, 6) pipettiert. Mit DEPC-Wasser wurde auf ein

Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl aufgefüllt. Dies entsprach bei den Ansätzen mit Probe A einem Einsatz von 1,9 µg total RNA und bei den Reaktionen mit dem *E. coli*-Standard 2,0 µg total RNA. Dies war eine deutlich größere Menge als in den ersten beiden Versuchen, wo 120-220 ng eingesetzt wurden (vergleiche 4.3.2 und 4.3.3) und entsprach der vom Kit vorgegebenen oberen Grenze des maximalen Einsatzes von 2 µg total RNA pro 20 µl-Reaktion [URL-11: S.6]. Zum Master Mix der NT-Ansätze (10, 11) wurden 10 µl DEPC-Wasser gegeben.

Tabelle 4: Reaktionsansätze im Versuch 4

Probennummerierung	Beschreibung
1,2	RT-PCR mit Random Primern und Probe A
3	RT-PCR mit Random Primern und <i>E. coli</i> -Standard
4,5	RT-PCR mit 16S rRNA-Primern und Probe A
6	RT-PCR mit 16S rRNA-Primern und <i>E. coli</i> -Standard
7	RT-PCR ohne Primer
8	RT-PCR ohne Reverse Transkriptase mit Random Primern
9	RT-PCR ohne Reverse Transkriptase mit 16S rRNA-Primern
10	NT-Kontrolle mit Random Primern
11	NT-Kontrolle mit 16S rRNA-Primern

Nach der cDNA-Synthese wurden alle 11 Proben mittels RNA Cleanup (siehe 4.3.2) aufgereinigt. Dieser Schritt wurde hinzugefügt, da für eine gut funktionierende PCR unter anderem genau definierte Konzentrationen von Magnesiumchlorid oder Nukleotiden von großer Bedeutung sind (siehe 2.4.1). Dies konnte besser gewährleistet werden, indem zwischen der RT-PCR und der PCR nochmals eine Aufreinigung der Proben erfolgte.

Die PCR wurde analog 4.3.2 durchgeführt. Zum Master Mix wurden 11,5 µl entsprechende Probe pipettiert.

Nach Beendigung der PCR wurden alle 11 Proben sowohl nach der RT-PCR als auch nach der PCR auf ein 1,2% Agarosegel aufgetragen. Von den aufgereinigten RT-PCR-Proben wurden 10 µl plus 1 µl 11x Ladungspuffer Orange G aufgetragen, von den PCR-Proben je 4 µl sowie 10 µl 1 kb DNA-Standard und der *E. coli*-Standard analog 4.2.6. Die Laufzeit betrug 40 min bei 100 V.

4.3.5 Versuch 5: Veränderung des Denaturierungsschrittes in der RT-PCR

In diesem Versuch war die Überlegung den Denaturierungsschritt zu Beginn des RT-PCR-Programmes zu variieren. Hierfür wurde zunächst wieder analog 4.2 mit dem MasterPure™ RNA Purification Kit im Doppelansatz RNA aus *E. coli* extrahiert, danach entsprechend 4.2.5 mit beiden Proben (A/B) der DNase-Verdau nach dem *Rigorous DNase treatment*-Protokoll durchgeführt und anschließend erfolgte die Aufreinigung der Proben nach dem RNA Cleanup-Protokoll (siehe 4.3.2). Die Konzentrationsmessung mit dem Spektrophotometer ergab 486 ng total RNA/μl für Probe A und 314 ng total RNA/μl für Probe B. Die anschließende cDNA-Synthese mit den 16S rRNA-Primern UniBac und Univ wurde daraufhin, wie in 4.3.2 beschrieben, mit der Extraktionsprobe A durchgeführt. Für diesen Versuch wurde jedoch die Denaturierungstemperatur im RT-PCR-Programm (siehe Abbildung 10) von 65 °C auf 50 °C reduziert und die Denaturierungszeit variierte für je 3fach Ansätze zwischen 60 und 0 min. Es wurden wieder Kontrollproben ohne Primer (*neg*), ohne Probe (*NT*) und ohne Reverse Transkriptase (*-RT*) mitgeführt. Zu je 10 μl Master Mix wurden 4 μl der Probe A pipettiert und mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μl aufgefüllt. Dies entsprach einem Einsatz von 1,94 μg total RNA pro Reaktion. Die durchgeführten Reaktionsansätze und ihre *Probennummerierungen* sind im einzelnen in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Denaturierungszeit verschiedener RT-PCR-Reaktionsansätze im Versuch 5

Probennummerierung	Denaturierungszeit [min]
<i>neg, NT, -RT</i>	60
<i>1, 2, 3</i>	60
<i>4, 5, 6</i>	45
<i>7, 8, 9</i>	30
<i>10, 11, 12</i>	15
<i>13, 14, 15</i>	0

Danach wurden alle Proben mit dem RNA Cleanup Protokoll aufgereinigt und die PCR analog 4.3.2 angeschlossen. Dabei wurden je 11,5 μl aufgereinigte RT-PCR entsprechend zum Master Mix gegeben. Nach Beendigung der PCR erfolgte die Beladung zweier 1,2 % Agarosegele analog Versuch 4 (siehe 4.3.4). Die Laufzeit betrug 45 min bei 100 V.

4.3.6 Versuch 6: Restriktionsverdau

Nachdem in Versuch 5 erfolgreich ein Amplifikationsprodukt von ungefähr 1,5 kb gebildet werden konnte, galt es nun dieses Ergebnis zu wiederholen und mittels Restriktionsverdau zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um das spezifische Produkt der 16S rRNA handelte.

Um ein geeignetes, für die 16S rRNA-Sequenz spezifisches Restriktionsenzym zu finden, wurde zunächst mit ClustalW [Larkin et al., 2007] unter Standardeinstellungen eine Konsensussequenz aus den sieben im Genom von *E. coli* vorliegenden 16S rRNA-Sequenzen [URL-9] erstellt. Diese Konsensussequenz wurde in das von New England BioLabs zur Verfügung gestellte Tool NEBcutter [URL-15] eingefügt und alle Enzyme, die diese Sequenz schneiden wurden ausgegeben. Auswahlkriterien für ein Restriktionsenzym waren, dass sich die entstehenden Fragmentgrößen deutlich unterscheiden, um das Produkt später in einem Agarosegel gut auftrennen zu können und dass es möglichst vorrätig war. Desweiteren sollte es die 23S rRNA-Sequenz nicht schneiden. Dieses Kriterium wurde überprüft in dem die sieben 23S rRNA-Sequenzen aus dem Genom von *E. coli* [URL-9] extrahiert wurden, mit ClustalW deren Konsensussequenz erstellt und diese in den NEBcutter eingefügt wurde. Es ergab sich, dass das Enzym HindIII-HF alle Kriterien erfüllte. Es schneidet die Sequenz 5'- ∇ AGCT \blacktriangle -3', dabei entsteht ein 5'-Überhang der Sequenz AGCT. Die 16S rRNA-Konsensussequenz wird bei 80/84 und 648/652 nt geschnitten, womit nach dem Restriktionsverdau Fragmente von etwa 80, 568 und 857 nt entstehen sollten.

Die RNA-Extraktion aus *E. coli* und der DNase-Verdau wurden analog Versuch 5 (vergleiche 4.3.5) durchgeführt. Alle Aufreinigungsschritte wurden nun aus Kostengründen mit einer Alkoholfällung durchgeführt. Hierzu wurden 1/8 Volumen 3 M Natriumacetat und 1 Volumen Isopropanol (-20 °C) zur Probe gegeben, die Probe 40 mal invertiert und 15 min bei 14100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und das Pellet im geöffneten Tube, mit einem Tuch abgedeckt, trocknen gelassen bis es klar war. Das Pellet wurde in 26 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

Für die anschließende RT-PCR (siehe 4.3.2) wurden 2,0 µg total RNA eingesetzt. Es wurden Reaktionsansätze mit den Random Primern bzw. mit den 16S rRNA-Primern UniBac und Univ durchgeführt. Zusätzlich wurde mit jedem Primerpaar eine

Positivkontrolle mit *E. coli*-Standard, eine NT-Kontrolle sowie eine Kontrollprobe ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Eine Übersicht über die verschiedenen Reaktionsansätze und deren *Nummerierung* liefert Tabelle 6. Der Thermocycler durchlief nun jedoch aufgrund der Ergebnisse des vorherigen Versuches das in Abbildung 10 dargestellte RT-PCR-Programm *ohne* die Denaturierung bei 65 °C.

Tabelle 6: Probennummerierung Versuch 6

Probennummerierung	Beschreibung
1,2	RT-PCR mit 16S rRNA-Primern und Probe
3	RT-PCR mit 16S rRNA-Primern und <i>E. coli</i> -Standard
4,5	RT-PCR mit Random Primern und Probe
6	RT-PCR mit Random Primern und <i>E. coli</i> -Standard
7	NT-Kontrolle mit 16S rRNA-Primern
8	NT-Kontrolle mit Random Primern
9	RT-PCR ohne Reverse Transkriptase mit 16S rRNA-Primern
10	RT-PCR ohne Reverse Transkriptase mit Random Primern

Die Proben wurden anschließend mittels Alkoholfällung aufgereinigt. Die PCR erfolgte wie in 4.3.2 beschrieben. Zu 20 µl Master Mix wurden je 5 µl entsprechende RT-PCR-Probe pipettiert. Zusätzlich wurden zu 20 µl PCR-Master Mix ohne jegliche Primer je 5 µl der Proben 2 bzw. 5 pipettiert, diese PCR-Ansätze werden mit 11 und 12 nummeriert und entsprechen den Negativkontrollen ohne Primer. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben 1-6 für einen anschließenden Restriktionsverdau mittels Alkoholfällung aufgereinigt. Die Messung ihrer DNA-Konzentration mit dem Spektrophotometer ergab für Probe 1: 63 ng/µl, Probe 2: 60 ng/µl, Probe 3: 70 ng/µl, Probe 4: 94 ng/µl, Probe 5: 95 ng/µl, Probe 6: 92 ng/µl. Für den Restriktionsverdau wurden sechs Reaktionen nach dem folgenden Schema (Tabelle 7) pipettiert.

Tabelle 7: Pipettierschema Restriktionsverdau

Probennummer	1	2	3	4	5	6
Probenvolumen [µl] / DNA-Menge [ng]	7,0 / 441	7,0 / 420	7,0 / 490	5,3 / 498	5,3 / 503	5,5 / 506
Puffer 4 [µl]	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
HindIII-HF [µl]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
DEPC-Wasser auffüllen auf [µl]	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0

Alle sechs Ansätze wurden auf dem Heizblock 30 min bei 37 °C inkubiert. Mit dem verwendeten Puffer und bei 37°C besitzt das Enzym eine 100 %ige Aktivität. Abschließend wurden alle Proben auf 1,2 % Agarosegele aufgetragen. Die Beladung mit den RT-PCR-Proben, den PCR-Proben, dem 1 kb DNA-Standard und dem *E. coli*-Standard erfolgte analog 4.3.4. Weiterhin wurden 20 µl der Restriktionsverdauansätze plus 2 µl 11x Ladungspuffer Orange G und 10 µl 100 bp DNA-Standard aufgetragen. Die Laufzeit betrug 43 min bei 100 V.

4.4 RNA-Extraktion aus einer Biogasprobe

Im folgenden soll die Etablierung einer qPCR-Methode für das *mcrA*-Gen aus einer Biogasprobe erfolgen. Dazu ist es zunächst notwendig RNA in ausreichend guter Qualität aus solch einer komplexen Umweltprobe extrahieren zu können.

Die benötigte Biogasprobe wurde dem Fermenter der Agrargenossenschaft Hainichen-Pappendorf entnommen. Die Probe wurde vor Ort aliquotiert und sofort gekühlt. Einige Proben wurden dabei in ihrer reinen Form zu je circa 15 ml abgefüllt (im folgenden als *reine Biogasprobe* bezeichnet), andere Proben wurden in einem 2:1-Volumenverhältnis zu 10 ml RNAprotect-Reagent gegeben (im folgenden als *Biogasprobe + RNAprotect* bezeichnet). Alle Proben wurden gekühlt ins Labor transportiert, wo die reinen Biogasproben umgehend bei - 86 °C eingefroren wurden. Die Proben mit RNAprotect wurden gevortext, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben wurden ebenfalls bei - 86 °C gelagert [URL-17].

Versuch 7: RNA-Extraktion aus einer Biogasprobe mit den Methoden GTC, EP, MP, TRI und BB

Für die RNA-Extraktion aus einer Biogasprobe wurden die Extraktionsmethoden ähnlich wie in 4.2 beschrieben angewandt. Abweichungen der Protokolle sind im folgenden aufgeführt.

Für jede Methode wurde die Extraktion im 4fach Ansatz durchgeführt. Eine bei - 86 °C gelagerte reine Biogasprobe wurde für 2 h bei 4 °C und etwa 15 min bei Raumtemperatur aufgetaut. Als Ausgangsmaterial für jeden Ansatz diente circa 1 ml Probe.

Die Zelllyse

Bei den Methoden GTC und BB erfolgte eine Zugabe von 1500 µl GTC und 38 µl Sarcosyl. Die Zelllyse der EP-Methode wurde mit 1500 µl Extraktionspuffer, 18,75 µl Proteinase K und 38 µl Sarcosyl durchgeführt. Bei der TRI-Methode wurden 2 ml TRI-Reagent und keine Natriumchloridlösung zugegeben. Die Ultraschall-Lyse konnte aufgrund zu starker Schaumbildung nur 45 s durchgeführt werden. Für die MP-Methode wurden diesmal 6 µl Proteinase K und 1 ml 2X T and C Lysis Solution pro Reaktionsansatz verwendet. Alle anderen Bedingungen waren analog zu 4.2.2.

Abtrennung der Proteine

In den Methoden GTC, EP und BB wurden im ersten Schritt je 1000 µl 24:1 Chloroform-Isoamylalkohol, bei der TRI-Methode 400 µl Chloroform, zugegeben. Nach 5 min vortexen erfolgte die Zentrifugation 15 min bei 3000 x g. Je 1200 µl wässrige Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Protokoll wurde weiter analog 4.2.3 ausgeführt. Die Abtrennung der Proteine mit dem MP-Kit erfolgte wie in 4.2.3 beschrieben, wurde jedoch zweimal ausgeführt.

Ausfällung der gesamten Nukleinsäuren

Dieser Schritt erfolgte bei allen Methoden analog zu 4.2.4, jedoch wurde der Waschschrift mit Ethanol zweimal durchgeführt. Die Pellets aller Ansätze wurden in je 50 µl TE-Puffer gelöst.

Je zwei der vier Reaktionsansätze aller Methoden wurden im Anschluss zusätzlich mit Extraktionspuffer behandelt, da das in ihm enthaltene CTAB die Huminsäure-Kontamination reduziert [Zhou, Bruns & Tiedje, 1996 : S.317]. Dazu wurden je 700 µl Extraktionspuffer (4 °C) zu den in 50 µl gelösten Pellets gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es schloss sich eine nochmalige Ausfällung der Nukleinsäuren (siehe 4.2.4) an. Die Pellets wurden wieder in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Mit je 10 µl aller Reaktionsansätzen wurde eine DNase-Verdau nach dem *Rigorous DNase treatment*-Protokoll durchgeführt (4.2.5).

Anschließend wurde mit 5 µl jeder Probe eine Urea-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 4.2.6).

4.5 Implementierung einer RT-PCR und qPCR für die mcrA-RNA aus einer Biogasprobe

Ziel dieses Kapitels war es, die mcrA-RNA einer Biogasprobe zunächst in cDNA umzuschreiben und anschließend mittels qPCR zu vervielfältigen. Desweiteren wurde durch das Erstellen einer Standardkurve die Konzentration des mcrA-Transkriptes in der Probe bestimmt.

4.5.1 verwendete Primer

Für die Methyl Coenzym M Reduktase A existieren einige Primer. So zum Beispiel das ML-Primerset, mit dem eine große Bandbreite von verschiedenen Methanogenen abgedeckt werden kann. [Luton, 2002] verwendet die Primer MLf und MLr zur Etablierung einer PCR-Methode für alle bekannten Arten von Methanogenen. Der in dieser Arbeit verwendete forward-Primer mlas, mit der Sequenz 5'-ggg ggt gtm ggd ttc acm car ta-3', ist eine verkürzte Form des MLf-Primers. Er wurde konstruiert, um seine Schmelztemperatur besser der des reverse-Primers anzupassen und die spezifische Bindung zu verbessern. Der reverse-Primer mcrA-rev, mit der Sequenz 5'-cgt tca tbg cgt agt tvg grt agt-3', ist eine Konsensussequenz aus drei verschiedenen reverse-Primern. Das Primerpaar mlas und mcrA-rev wurde für 15 Gattungen aus 8 Familien von Methanogenen etabliert. Zu erwarten ist ein Amplifikationsprodukt etwa der Größe 460-490 bp [Steinberg & Regan, 2008; Nettmann et al., 2008; Luton, 2002].

4.5.2 Versuch 8: Amplifizieren der mcrA-RNA mittels qPCR

Für diesen Versuch wurde an einer reinen Biogasprobe die TRI-Extraktion mit zusätzlicher Extraktionspuffer-Behandlung im vierfach Ansatz (A-D) wie in 4.4 beschrieben durchgeführt, der anschließende *Rigorous treatment*-DNase-Verdau analog 4.2.5. Danach wurden die Proben mit einer Alkoholfällung (4.3.6) aufgereinigt und in 30 µl DEPC-Wasser gelöst.

Für die cDNA-Synthese mit dem High Capacity cDNA RT-Kit und dem mcrA-Primerset analog 4.3.2 wurde mit jeder der vier Proben ein Ansatz erstellt und je 2,0 µg total RNA eingesetzt. Desweiteren wurde für jede Extraktionsprobe eine Kontrollprobe ohne Reverse Transkriptase (-RT) sowie eine NT-Kontrolle mitgeführt. Der

Thermocycler durchlief das in Abbildung 10 dargestellte RT-PCR-Programm *ohne* die Denaturierung bei 65 °C.

Anschließend wurden alle Proben mittels Alkoholfällung (4.3.6) aufgereinigt und in je 20 µl DEPC-Wasser gelöst.

Für die folgende Vervielfältigung mittels qPCR wurden alle Reaktionsansätze auf Eis und aufgrund der hohen Sensibilität der qPCR unter der mit UV-Licht sterilisierten Sterilwerkbank pipettiert. Dafür wurde zunächst ein qPCR Master Mix, bestehend aus dem iTaqTM Universal SYBR[®] Green SuperMix, den Primern mlas und mcrA-rev sowie, wenn nötig, nukleasefreiem Wasser, nach dem in Tabelle 8 dargestellten Pipettierschema hergestellt.

Tabelle 8: Pipettierschema für den qPCR Master Mix

Reagent	Volumen/Reaktion [µl]
iTaq TM Universal SYBR [®] Green SuperMix	12,5
mlas (10 µM)	0,5
mcrA-rev (10 µM)	0,5
DNA-Template	x
DEPC-Wasser auffüllen auf	25

Zu je 20 µl Master Mix wurden 5 µl RT-PCR-Probe gegeben. Der Thermocycler mit MiniOpticonTM Real-Time PCR System durchlief das folgende, in Abbildung 13 dargestellte, Programm. Es gleicht dem PCR-Programm aus Abbildung 11, jedoch wurde nach jedem Elongationsschritt die Fluoreszenzstärke gemessen (in der Abbildung mit einer Kamera gekennzeichnet). Die finale Elongation wurde nicht durchgeführt, jedoch wurde zum Schluss eine Schmelzkurvenanalyse ausgeführt. Dafür erfolgte eine weitere Denaturierung für 10 s bei 95 °C und anschließend wurde in Schritten von 0,5 °C aller 5 s die Temperatur von 65 auf 95 °C erhöht. Dabei wurde wieder jeweils die Fluoreszenz gemessen. Nach Abschluss des Programmes wurden die Proben bei 4 °C gekühlt. Zum Erstellen des qPCR-Programmes sowie zur Auswertung der Daten wurde die zugehörige CFX ManagerTM Software Version 3.0 von Bio-Rad verwendet.

Anschließend wurden je 10 µl der qPCR-Proben mit 1 µl 11x Ladungspuffer Orange G versehen und auf ein 1,2 % Agarosegel aufgetragen. Es wurde der 100 bp DNA-Standard mitgeführt. Die Laufzeit betrug 43 min bei 100 V.

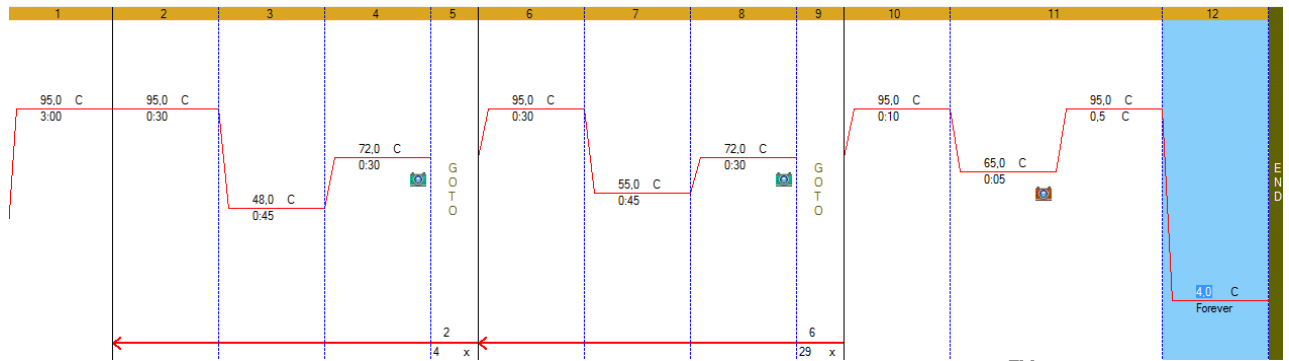


Abbildung 13: Temperaturzyklus der qPCR in Versuch 8 [erstellt mit der CFX Manager™ Software Version 3.0 von Bio-Rad]

Der Thermocycler durchlief nach der initialen 3 min Denaturierung bei 95 °C fünf initiale Zyklen, bestehend aus Denaturierung 30 s bei 95 °C, Annealing 45 s bei 48 °C und Extension 30 s bei 72 °C. Es schlossen sich 30 weitere Zyklen, mit der Denaturierung 30 s bei 95 °C, Annealing 45 s bei 55 °C und Extension 30 s bei 72 °C, an. Für die anschließende Schmelzkurvenanalyse wurde aller 5 s die Temperatur mit einer Schrittweite von 0,5 °C von 65 auf 95 °C erhöht. In jedem mit einer Kamera markierten Schritt wurde die Fluoreszenzintensität gemessen.

4.5.3 Versuch 9: Optimierung der qPCR-Reaktion

Dieser Versuch wurde bis zur Aufreinigung der Proben nach dem DNase-Verdau analog Versuch 8 (4.5.2) durchgeführt. Die cDNA-Synthese erfolgte im vierfach Ansatz, an dieser Stelle jedoch mit dem MMLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis Kit. Zunächst wurden für jeden Ansatz 1 µg total RNA (mehr erlaubt dieses Kit nicht) mit je 1 µl Primer mlas und mcrA-rev (10 µM) gemischt und mit nukleasefreiem Wasser auf 12,5 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde 2 min bei 65 °C inkubiert. Weiterhin wurde ein MasterMix aus 2 µl Puffer, 2 µl DTT, 2 µl dNTP, 0,5 µl Inhibitor und 1 µl Reverse Transkriptase pro Reaktionsansatz hergestellt und je 7,5 µl wurden zu dem Primer-Probe-Gemisch pipettiert [URL-18]. Es wurde eine NT-Kontrolle und ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Der Thermocycler durchlief das in Abbildung 10 dargestellte RT-PCR-Programm *ohne* die Denaturierung bei 65 °C. Nach Beendigung des Programmes wurden die vier Reaktionsansätze gepoolt und aufgereinigt.

Im Anschluss wurden Annealingtemperatur und -zeit der qPCR aufgrund der unspezifischen Gelbanden in Versuch 8 mit Hilfe einer Gradienten-PCR optimiert. Die fünf initialen Zyklen wurden entfernt, die Zahl der folgenden Zyklen von 30 auf 35 erhöht (vergleiche Abbildung 13). Im ersten Teilversuch blieb die Annealingzeit von 45 s bestehen und das PCR-Gerät erzeugte für die Annealingtemperatur einen Temperaturgradienten im Bereich 51-61 °C. Für die qPCR-Reaktion wurde ein Master

Mix aus 12,5 µl iTaqTM Universal SYBR[®] Green SuperMix, je 0,5 µl Primer mlas und mcrA-rev (10 µM), 8,5 µl nukleasefreiem Wasser und 2,6 µl cDNA-Probe pro Reaktionsansatz hergestellt. Dies entspricht einem Einsatz von rund 225 ng Nukleinsäuren pro Reaktionsansatz. Je drei Ansätze hatten eine Annealingtemperatur von 51,0 / 51,7 / 53,0 / 54,9 / 57,3 / 59,3 / 60,4 oder 61,0 °C. In einem zweiten, bis zur qPCR analog durchgeführten, Versuch wurde die Annealingzeit auf 30 s verkürzt und je drei Reaktionsansätze wurden bei den Annealingtemperaturen 61,0 / 61,8 / 63,2 / 65,4 / 68,0 / 70,2 / 71,4 / 72,0 °C durchgeführt. Es wurde also insgesamt ein Temperaturgradient der Annealingtemperatur von 51-72 °C abgedeckt. Die cDNA-Synthese im zweiten Versuch wurde wieder mit dem High Capacity cDNA RT Kit (4.3.2) und 2 µg total RNA pro cDNA-Synthese-Reaktion durchgeführt. Für die qPCR wurden jedoch wie im ersten Teilversuch 225 ng Nukleinsäuren eingesetzt, sodass beide Teilversuche dennoch vergleichbar sind. Abschließend wurden 10 µl aller qPCR-Proben mit 1 µl 11x Ladungspuffer Orange G versehen und auf ein 1,2 % Agarosegel aufgetragen. Es wurden 10 µl 100 bp DNA-Standard mitgeführt. Die Laufzeit betrug 43 min bei 100 V.

4.5.4 Versuch 10: Erstellen einer Standardkurve

Hierfür wurde zunächst die restliche qPCR-Probe des Versuchsansatzes mit 30 s Annealingzeit und 61 °C Annealingtemperatur aus Versuch 9 mit dem GeneJet GelExtraction Kit aufgereinigt. Dafür wurden je 1 Volumen Bindungspuffer und Isopropanol (-20 °C) zur Probe gegeben und alles vermischt. Die gesamte Lösung wurde in eine Aufreinigungssäule mit einem 2 ml-Tube überführt, 60 s bei 10000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es wurden 700 µl Waschpuffer in die Säule gegeben, 60 s bei 10000 x g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und nochmals 60 s bei 10000 x g zentrifugiert. Die Aufreinigungssäule wurde in ein sauberes 1,5 ml-Tube platziert und 50 µl Elutionspuffer wurden auf die Membran gegeben. Nach einer weiteren 60 s Zentrifugation bei 10000 x g wurde die Säule verworfen.

Die anschließende Konzentrationsmessung mit dem Spektrophotometer ergab 35,5 ng DNA/µl. Zwar enthält die Probe auch noch die für die cDNA-Synthese eingesetzte totale RNA, jedoch im Vergleich zu dem amplifizierten DNA-Produkt in so geringer Menge, dass dies vernachlässigbar ist und die gemessene Konzentration als die des mcrA-Amplikons betrachtet werden kann.

Für die anschließende Erstellung einer Standardkurve 1 mit der qPCR wurden 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} -Verdünnungen der aufgereinigten Probe hergestellt. Die qPCR-Ansätze wurden nach dem in Tabelle 8 aufgeführten Schema pipettiert und je 10 µl unverdünnte bzw. verdünnte Probe wurden zum Master Mix hinzugegeben. Dies entspricht einem Mengeneinsatz von $3,55\text{E}+02$ ng (mit der unverdünnten Probe) bis $3,55\text{E}-04$ ng (mit der 10^{-6} -Verdünnung) mcrA-DNA pro Reaktionsansatz. Die Versuche wurden in dreifach Ansätzen durchgeführt und eine NT-Kontrolle mitgeführt. Das qPCR-Programm wurde nach dem Ergebnis von Versuch 9 wie folgt gewählt: Nach einer 3 min initialen Denaturierung bei 95 °C folgten 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung 30 s bei 95 °C, Annealing 30 s bei 61 °C und Elongation 30 s bei 72 °C. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte wie in 4.5.2 beschrieben. Nach Beendigung des Programmes wurde die Temperatur bei 10 °C gehalten.

Der komplette Versuch wurde mit einer anderen reinen Biogasprobe wiederholt. Der Mengeneinsatz an mcrA-Amplikon für die mittels qPCR zu erstellende Standardkurve 2 betrug bei diesem Versuch $4,2\text{E}+01$ ng (mit einer 10^{-1} -Verdünnung) bis $4,2\text{E}-06$ ng (mit einer 10^{-8} -Verdünnung). Aufgrund von Schwankungen innerhalb einiger Triplikate im ersten Versuch, wurde nun für jeden Verdünnungsansatz ein Mix aus iTaqTM Universal SYBR[®] Green SuperMix, Primern, nukleasefreiem Wasser und Probe hergestellt und dann zu je 25 µl auf die Reaktionsgefäße verteilt.

4.5.5 Versuch 11: Überprüfung der mcrA-Konzentration in unterschiedlich gelagerten Biogasproben

Als Ausgangsmaterial für diesen Versuch diente je eine reine Biogasprobe und eine mit RNAProtect gelagerte Probe (siehe 4.4). Die RNA-Extraktionen im Doppelansatz (A/B), anschließender DNase-Verdau und die cDNA-Synthese wurden analog 4.5.2 durchgeführt. Die cDNA-Synthese wurde für alle Extraktionsproben im Doppelansatz mit je 2,0 µg eingesetzter total RNA durchgeführt. Für jede Probe wurde eine Kontrollprobe ohne Reverse Transkriptase sowie eine NT-Kontrolle mitgeführt. Alle Proben wurden aufgereinigt und die Doppelansätze gepoolt. Es wurde eine qPCR nach 4.5.4 mit je 5 µl entsprechender Probe durchgeführt. Für jede cDNA-Probe (*je A/B ohne und mit RNAProtect*) wurde die qPCR als Triplikatansatz durchgeführt. 5 µl der vier verschiedenen Extraktionsproben wurden analog 4.2.6 denaturiert und auf ein

1,2 % Agarosegel aufgetragen. Ebenso wurden je 10 μ l aller qPCR-Proben mit 1 μ l 11x Ladungspuffer Orange G und 10 μ l des 100 bp DNA-Standards aufgetragen.

5 Ergebnisse & Diskussion

In diesem Kapitel werden in entsprechender Reihenfolge die Ergebnisse aller durchgeführten Methoden aufgeführt und ausgewertet.

Anzumerken ist, dass sämtliche Gelbilder für einen besseren Druck mit dem Programm paint.net v3.5.11 [URL-16] bearbeitet wurden. Sie liegen der Arbeit jedoch in digitaler Form auch als Original bei.

5.1 Versuch 1: verschiedene Methoden der RNA-Extraktion aus *Escherichia coli*

Nachdem, wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, RNA mit Hilfe fünf verschiedener Methoden aus *E. coli* extrahiert wurde, ergab die Quantitätsprüfung mit dem Spektrophotometer die folgenden, in Abbildung 14 aufgezeigten, Ergebnisse. Die Verteilung der RNA-Ausbeuten ist zugehörig zur jeweiligen Extraktionsmethode in einem Boxplot dargestellt. Die unteren bzw. oberen Begrenzungen der Boxen entsprechen dem unteren bzw. oberen Quartil der Datenmenge, der Balken in der Box ist der Median. Sogenannte Whisker führen zum kleinsten bzw. größten nichtextremen Wert. Ist der Abstand zum unteren oder oberen Quartil größer als das 1,5fache des Interquartilsabstandes, werden diese Werte als kreisförmige Ausreißer dargestellt.

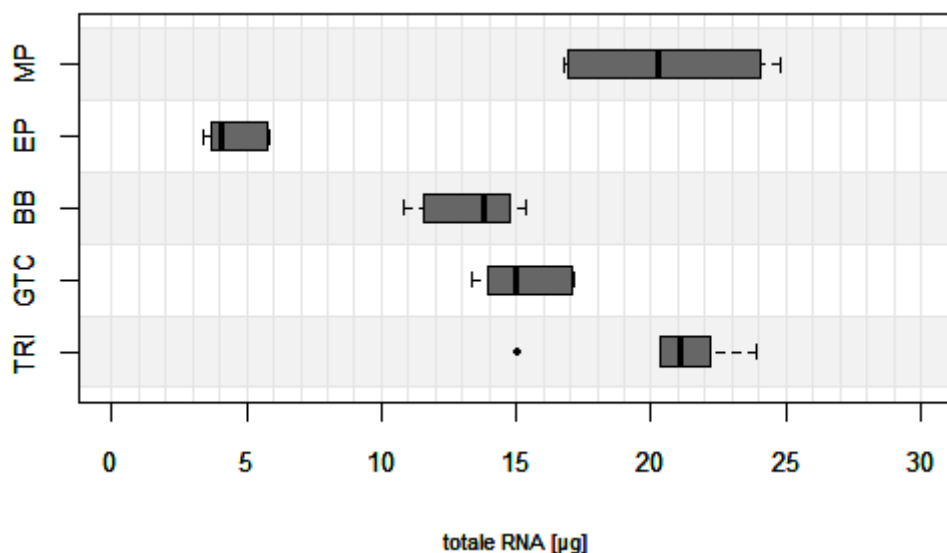


Abbildung 14: RNA-Ausbeute verschiedener Extraktionsmethoden angewandt auf *E. coli*

Mittels RStudio erstelltes Boxplot-Diagramm über die Verteilung der RNA-Ausbeute [µg] von *E. coli* je sechs unabhängiger Parallelversuche für die Extraktionsmethoden TRI, GTC, BB, EP und MP.

Um den Unterschied zwischen den Medianen der fünf verschiedenen Methoden für die RNA-Ausbeute auf Signifikanz zu überprüfen, wurde desweiteren ein t-Test durchgeführt. Der Unterschied wird als signifikant angesehen, wenn für den resultierenden p-Wert gilt $< 0,05$. Andernfalls ist ein Unterschied nicht signifikant. Die jeweiligen p-Werte dieser paarweisen t-Tests sind in Tabelle 9 dargestellt. Rot hinterlegt sind die Methoden, deren Mediane sich nicht signifikant unterscheiden, blau hinterlegt jene, deren Mediane sich signifikant unterscheiden.

Tabelle 9: paarweiser t-Test für verschiedene Methoden der RNA-Extraktion aus *E. coli*

Dargestellt sind die p-Werte paarweiser t-Tests. Gilt p-Wert $< 0,05$ unterscheiden sich die Mediane dieser zwei Methoden signifikant (blau), andernfalls ist dieser Unterschied nicht signifikant (rot).

	TRI	GTC	BB	EP	MP
TRI	1				
GTC	0.005373	1			
BB	0.0009429	0.09159	1		
EP	0.000013	0.0000002601	0.000007999	1	
MP	0.9637	0.01059	0.002144	0.00003427	1

Nach der quantitativen Analyse der RNA-Extraktionen lässt sich feststellen, dass die Methoden TRI und MP die größten RNA-Ausbeuten liefern. Der t-Test ergibt, dass sich die Mediane dieser beiden Datenmengen nicht signifikant unterscheiden. Die geringste RNA-Menge liefert die Methode EP. Die Methoden BB und GTC liegen in einem mittleren Bereich und unterscheiden sich in ihrem Median nicht signifikant.

Die qualitative Analyse der verschiedenen RNA-Extraktionsmethoden mittels Urea-Gelelektrophorese lieferte das in Abbildung 15 dargestellte Ergebnis. Außer bei der TRI-Methode, wird mit allen Extraktionsmethoden sowohl RNA als auch DNA aus den Proben extrahiert, was den anschließenden DNase-Verdau erforderlich machte. Die Proben GTC, EP und MP liegen in einer sehr guten Qualität vor. Es sind scharfe Banden in Höhe 16S und 23S rRNA zu erkennen, der gleichmäßige Schmier deutet auf mRNA hin. Bei der BB-Methode war die RNA-Ausbeute zu gering, sodass auf dem Gel nur sehr zarte Banden in Höhe 16S und 23S rRNA vor dem DNase-Verdau zu erkennen sind.

Während sich nach der quantitativen Analyse kein signifikanter Unterschied in der RNA-Ausbeute zwischen den beiden ertragsreichsten Methoden TRI und MP erkennen

ließ, wird auf dem Gelbild deutlich, dass die MP-Proben in deutlich besserer Qualität vorliegen, was ein noch wichtigeres Merkmal als die reine Ausbeute ist. Bei der TRI-Probe ist ein starker Schmier unterhalb der 16S rRNA sichtbar, was auf einen deutlichen Abbau der Probe schließen lässt. Die TRI-Methode erfordert teilweise ein semisteriles Arbeiten und beinhaltet somit die größte Gefahr einer Kreuzkontamination. Desweiteren wird die Probe durch die Ultraschall-Lyse stark beansprucht und so Transkripte eventuell fragmentiert.

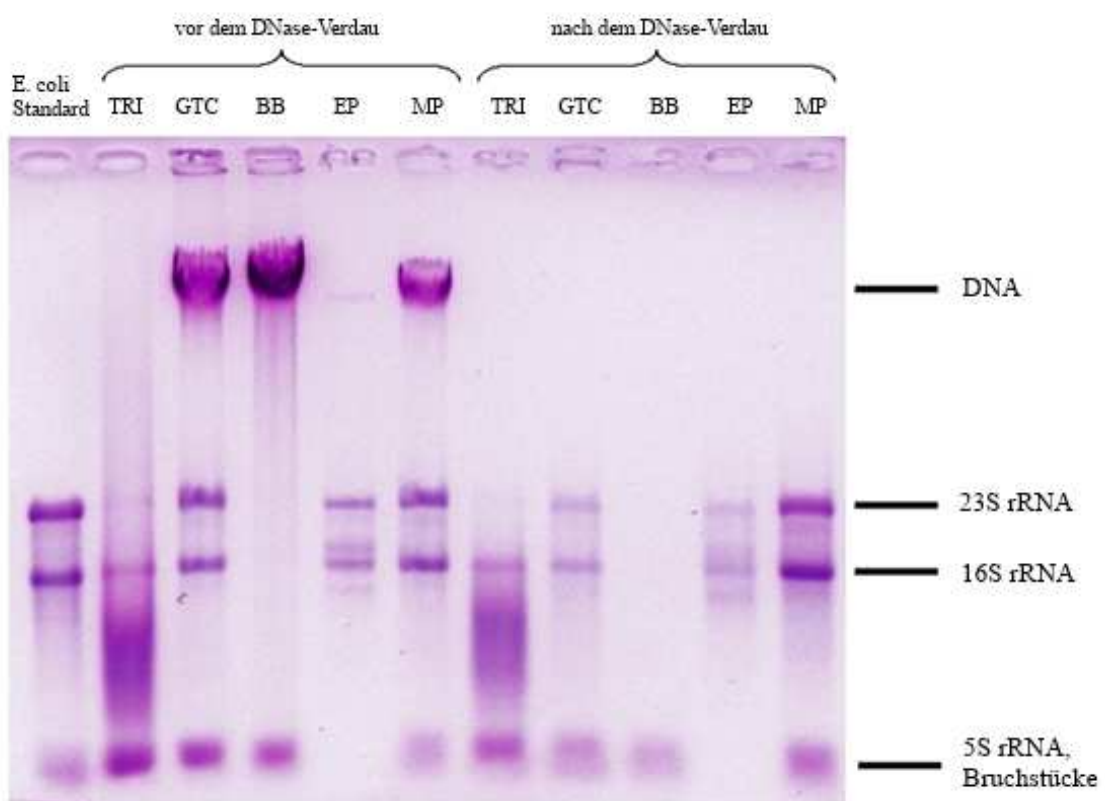


Abbildung 15: Gelbild Versuch 1 - 5 verschiedene Methoden der RNA-Extraktion aus *E. coli*

Die gepoolten 6fach Ansätze der verschiedenen Extraktionsmethoden wurden sowohl vor, als auch nach dem DNase-Verdau auf ein Agarosegel aufgetragen. Die TRI-Methode liefert für *E. coli* das beste Ergebnis.

Die Konzentrationsmessung ergab für die BB-Methode eine höhere RNA-Ausbeute als die EP-Methode. Auf dem Gelbild ist zu erkennen, dass es sich bei der BB-Methode dabei jedoch hauptsächlich um Bruchstücke handelt, während bei der EP-Methode 16S und 23S rRNA in guter Qualität vorliegen.

Für den Organismus *E. coli* lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass die MP-Methode die höchste RNA-Ausbeute im Zusammenhang mit einer sehr guten Probenqualität

liefert. Somit wird diese Methode im folgenden für weitere RNA-Extraktionen aus *E. coli* angewandt. Dass dies nicht zwingend auch für andere Organismen gelten muss, ist in Kapitel 6 beschrieben.

5.2 Implementierung einer RT-PCR und PCR für die 16S rRNA von *E. coli*

5.2.1 Analyse der Primer UniBac und Univ

In Abbildung 16 ist das Ergebnis des Primer-BLAST-Durchlaufes mit den Primern UniBac und Univ gegen das komplette Genom von *E. coli* dargestellt. Zu erkennen ist, dass die verwendeten Primer ausschließlich an die sieben codierenden Sequenzen für die 16S rRNA binden. Die Lokalisierung der 16S rRNA-Sequenzen im *E. coli*-Genom lässt sich auch dem Sequenz-Format von [URL-9] entnehmen. Manuell wurde nochmals überprüft, dass die in Abbildung 16 angegebenen Bindestellen der Primer tatsächlich den 16S rRNA-Regionen entsprechen. Die Primer scheinen dem Primer-BLAST-Durchlauf zufolge spezifisch zu binden und eignen sich somit für die Implementierung der durchzuführenden Transkriptomanalyse-Methoden an der 16S rRNA. Nach einer PCR ist ein Amplifikationsprodukt der Länge 1505 bp zu erwarten (Abbildung 16 *product length*). Zusätzlich werden durch das Programm Primer-BLAST Angaben wie die Schmelztemperatur (T_m) und der GC-Gehalt (GC%) der Primer berechnet.

Der BLAST-Durchlauf gegen das *Homo sapiens*-Genom lieferte kein Ergebnis. Somit kann ausgeschlossen werden, dass spätere Amplifikationsprodukte aus Verunreinigungen mit menschlicher DNA stammen.

Primer pair				
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GAGTTTGATCNTGGNTCAG	19	42.25	47.06
Reverse primer	TACGGNTACCTTGTTACGACTT	22	54.16	42.86
Products on target templates				
>U00096.2 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome				
<div> <div> 1. product length = 1505 Features associated with this product: rRNA-16S ribosomal RNA of rrnH operon </div> <div> 2. product length = 1505 Features associated with this product: rRNA-16S ribosomal RNA of rrnG operon </div> </div>				
Forward primer	1 GAGTTTGATCNTGGNTCAG 19			
Template	223779A...C.... 223797			
Reverse primer	1 TACGGNTACCTTGTTACGACTT 22			
Template	225283T..... 225262			
<div> <div> 3. product length = 1505 Features associated with this product: rRNA-16S ribosomal RNA of rrnD operon </div> <div> 4. product length = 1505 Features associated with this product: rRNA-16S ribosomal RNA of rrnC operon </div> </div>				
Forward primer	1 GAGTTTGATCNTGGNTCAG 19			
Template	3426776A...C.... 3426758			
Reverse primer	1 TACGGNTACCTTGTTACGACTT 22			
Template	3425272T..... 3425293			
<div> <div> 5. product length = 1505 Features associated with this product: rRNA-16S ribosomal RNA of rrnA operon </div> <div> 6. product length = 1505 Features associated with this product: rRNA-16S ribosomal RNA of rrnB operon </div> </div>				
Forward primer	1 GAGTTTGATCNTGGNTCAG 19			
Template	4033562A...C.... 4033580			
Reverse primer	1 TACGGNTACCTTGTTACGACTT 22			
Template	4035066T..... 4035045			
<div> <div> 7. product length = 1505 Features associated with this product: rRNA-16S ribosomal RNA of rrnE operon </div> </div>				
Forward primer	1 GAGTTTGATCNTGGNTCAG 19			
Template	4206178A...C.... 4206196			
Reverse primer	1 TACGGNTACCTTGTTACGACTT 22			
Template	4207682T..... 4207661			

Abbildung 16: Primer-BLAST-Ergebnis 16S rRNA-Primer gegen das *E. coli*-Gesamtgenom

Die Primer UniBac und Univ wurden mit Primer-BLAST gegen das Gesamtgenom von *E. coli* (NC_000913) gelastet. Zu erkennen ist, dass die Primer spezifisch an den sieben 16S rRNA-Sequenzen im Genom von *E. coli* binden. Die zu erwartende Produktgröße nach einer PCR beträgt 1505 nt.

5.2.2 Versuch 2: RT-PCR mit genspezifischen Primern

Das Ergebnis dieses ersten Versuches mittels RT-PCR und PCR das 16S rRNA-Transkript einer RNA-Extraktionsprobe aus *E. coli* zu amplifizieren ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Beschriftung der Banden entspricht der in 4.3.2 gewählten Probennummerierung. Die Banden am unteren Rand der Laufspuren sind Primer, die nicht binden konnten. Bei allen nach der RT-PCR aufgetragenen Proben (*Spuren 2-8*) sind keine weiteren Banden zu erkennen. Allerdings wird bei diesen Proben der Bereich von circa 1,5-3,0 kb von einer, durch den Ladungspuffer verursachten, hellen Bande überdeckt. Da bei der Amplifizierung der 16S rRNA Banden der ungefähren Größe von 1,5 kb zu erwarten sind (siehe 5.2.1), ist an dieser Stelle festzuhalten, dass sich dieser

Ladungspuffer als ungeeignet für diese Versuche erweist, da er möglicherweise vorhandene Banden verdeckt. Jedoch sind bei den entsprechenden Proben auch nach der PCR keine Banden zu erkennen (*Spuren 14-22*), so dass es wahrscheinlicher ist, dass in diesem Fall nach der RT-PCR überhaupt keine Amplifikationsprodukte gebildet wurden.

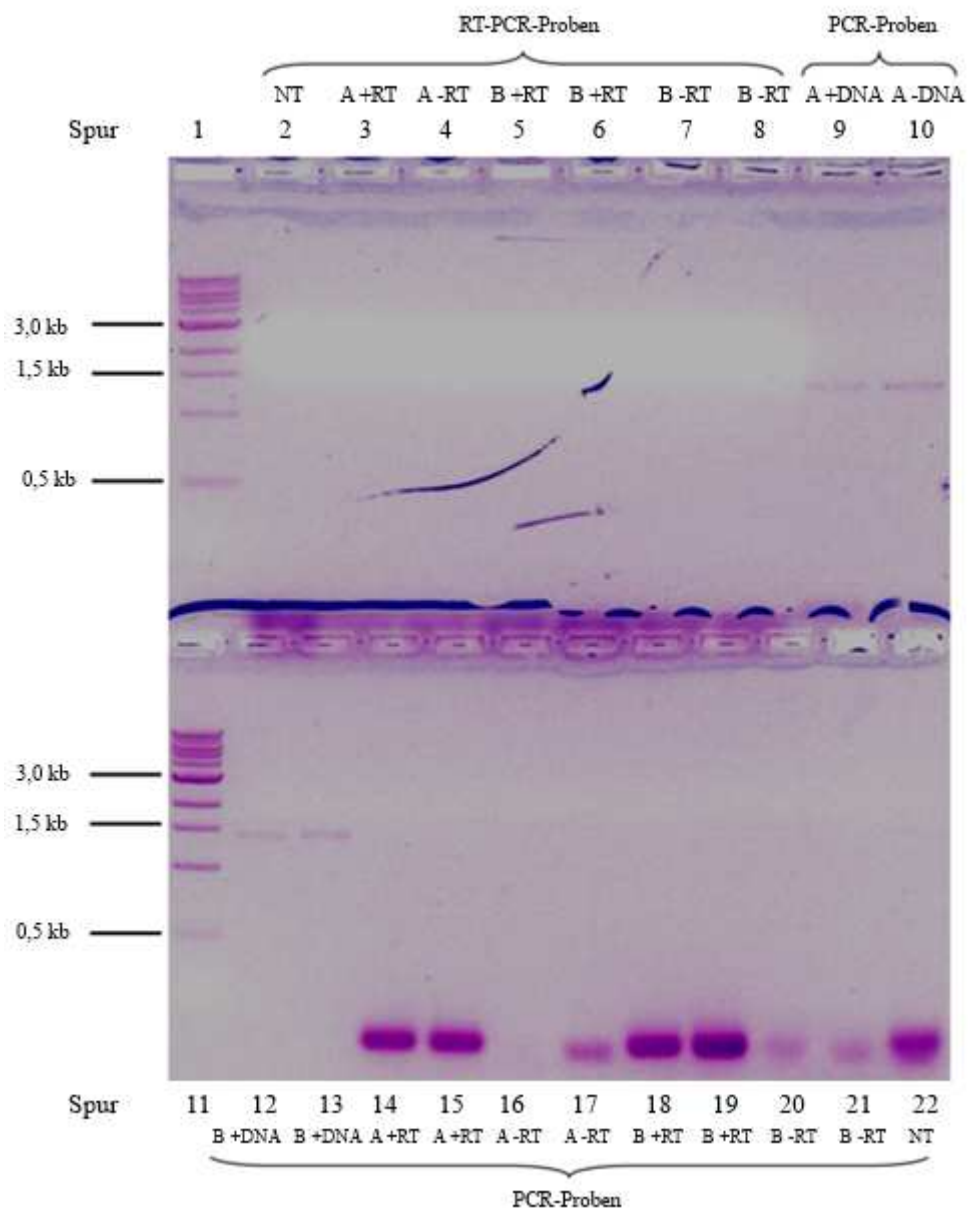


Abbildung 17: Gelbild Versuch 2 – RT-PCR mit genspezifischen Primern

In den Spuren 2-8 sind RT-PCR-Reaktionsansätze der DNase-verdauten Extraktionsproben A und B aufgetragen. Dabei wurden Kontrollproben ohne Reverse Transkriptase (-RT) und ohne Template (NT) mitgeführt. Spuren 14-22 beinhalten die entsprechenden Proben nach der PCR. Die Spuren 9-11 zeigen Proben die noch DNA enthielten nach der PCR. Deren circa 1,5 kb großen Banden lassen auf ein Funktionieren der PCR schließen. Die RT-PCR hat nicht funktioniert. In den Spuren 1 und 11 ist der 1 kb DNA-Standard aufgetragen.

Die vier PCR-Ansätze mit den Extraktionsproben *A* und *B* vor dem DNase-Verdau (*Spuren 9-12*) weisen Banden leicht unterhalb 1,5 kb auf. Es kann vermutet werden, dass es sich dabei um das Amplifikationsprodukt des 16S rRNA-Gens handelt. Daraus kann geschlossen werden, dass die Primer UniBac und Univ an die 16S rRNA-Sequenz auf der DNA binden konnten und die PCR unter den angegebenen Bedingungen funktioniert. Daraus lässt sich weiterhin schlussfolgern, dass es die RT-PCR war, die unter den gegebenen Voraussetzungen nicht funktionierte und das Problem in diesem Teil des Versuches zu suchen ist.

Die NT-Probe sollte in jedem Versuch mitgeführt werden, um eine Verunreinigung der Stammlösungen mit einem Amplikon auszuschließen [Farrell, 2009 : S.422]. Aufgrund des Nicht-Funktionierens der RT-PCR ist eine Auswertung dieser Probe an dieser Stelle jedoch nicht möglich.

Kontrollproben ohne Reverse Transkriptase (-RT) dienen der Kontrolle auf DNA-Verunreinigungen. Durch Weglassen der Reversen Transkriptase in der cDNA-Synthese-Reaktion könnten auftretende Banden nach einer angeschlossenen PCR einzig und allein durch eine Verunreinigung mit genomischer DNA verursacht worden sein [Farrell, 2009 : S.422-423]. Bei diesen Kontrollproben sind nach der PCR im Gelbild (*Spuren 16, 17, 20, 21*) keinerlei Banden zu erkennen. Da die PCR offenbar funktioniert hat und bei einer DNA-Verunreinigung die Entstehung eines Amplifikationsprodukts möglich gewesen wäre, lässt sich schlussfolgern, dass der DNase-Verdau vollständig funktioniert hat und die Proben frei von DNA waren.

5.2.3 Versuch 3: RT-PCR mit Random Primern

In diesem Versuch wurden im Gegensatz zu Versuch 2 anstelle der genspezifischen Primer UniBac und Univ die Random Primer verwendet. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 18 dargestellt.

Die Banden im unteren Bereich des Gels bei den *Spuren 16, 17, 22* und *23* sind Primer-Banden. Bei der breiten Bande im oberen Bereich der *Spuren 16-20* und *22-27* handelt es sich um die Laufspur des Ladungspuffers der Proben, welche in den oberen Geltaschen aufgetragen wurden. Bei allen -RT-Proben sind auch nach der PCR keine Banden zu sehen, woraus sich schließen lässt, dass sich keine kontaminierende DNA mehr in der Probe befindet. Die Negativkontrollen ohne Primer (*A/B neg*) wurden durchgeführt, um zu überprüfen ob unspezifischen Fragmente von der Größe des zu erwartenden Amplifikationsproduktes existieren. Da keine Banden bei diesen Proben zu

sehen sind, kann daraus geschlossen werden, dass dies nicht der Fall ist. Jedoch weisen auch alle +RT-Proben weder nach der RT-PCR, noch nach der PCR Banden auf. Da im vorherigen Versuch festgestellt werden konnte, dass die PCR funktioniert, kann nach diesem Versuch geschlussfolgert werden, dass die RT-PCR unter den angegebenen Bedingungen auch mit Random Primern nicht funktioniert. Somit kann auch in diesem Versuch die NT-Kontrolle nicht ausgewertet werden.

Die Vermutung an dieser Stelle ist, dass die eingesetzte Menge totaler RNA für die cDNA-Synthese eventuell zu gering ist. Dies gilt es in einem weiteren Versuch zu überprüfen.

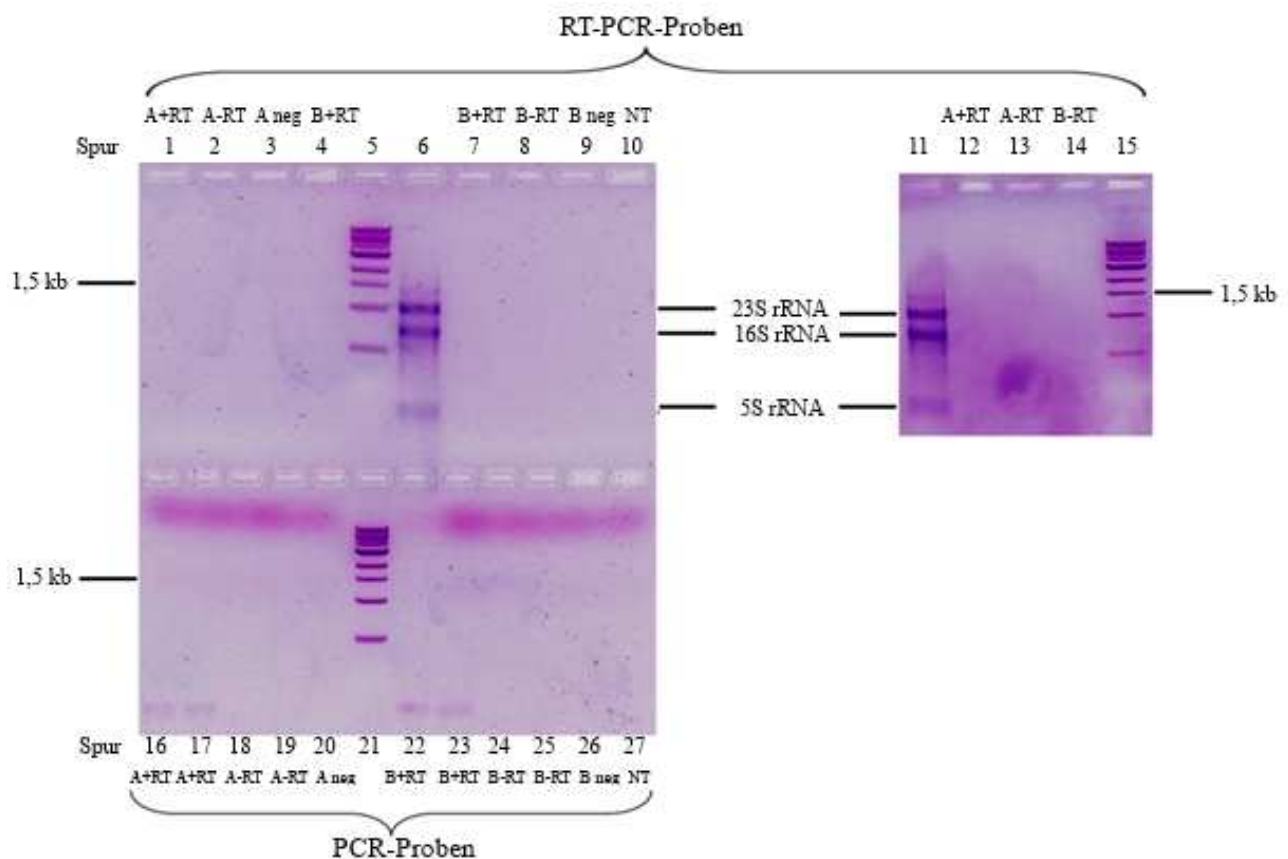


Abbildung 18: Gelbild Versuch 3 – RT-PCR mit Random Primern

In den Spuren 1-14 sind (mit Ausnahme der Spuren 5,6,11) RT-PCR-Reaktionsansätze der DNase-verdauten Extraktionsproben A und B -aufgetragen. Dabei wurden Kontrollproben ohne Reverse Transkriptase (-RT) ohne Template (NT) und ohne Primer (neg) mitgeführt. Spuren 16-27 beinhalten die entsprechenden Proben nach der PCR. In den Spuren 5, 15 und 21 wurde der 1 kb DNA-Standard aufgetragen; in den Spuren 6 und 11 der E. coli-Standard. Die RT-PCR hat in diesem Versuch nicht funktioniert.

5.2.4 Versuch 4: Einsatz einer größeren RNA-Menge in der RT-PCR

Das Ergebnis der Qualitätsüberprüfung von den DNase-verdauten RNA-Extraktionsproben A und B mit dem Bioanalyzer ist in Abbildung 19 dargestellt.

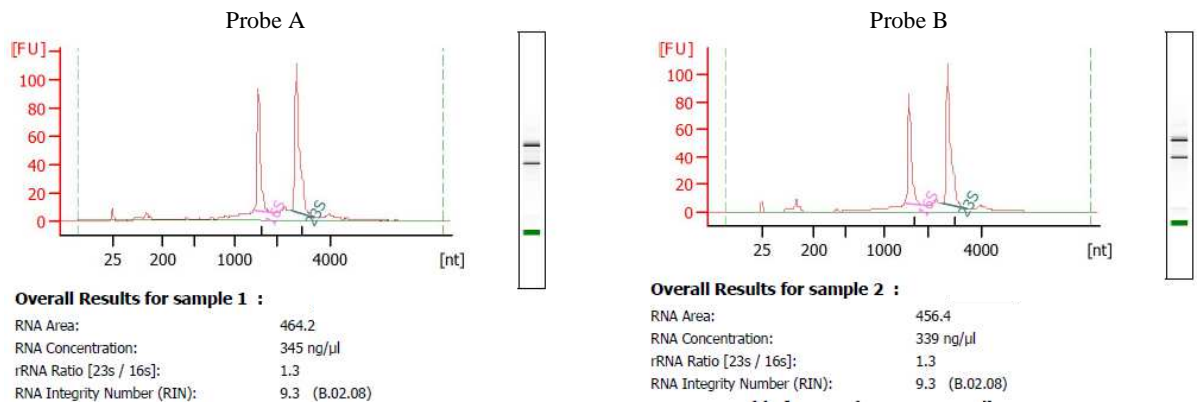


Abbildung 19: Analyse zweier RNA-Extraktionsproben aus Versuch 4 mit dem Bioanalyzer

Beide RNA-Extraktionsproben zeigen deutliche und schmale Peaks der 16S und 23S rRNA und liegen in einer sehr guten Qualität vor.

Auf der x-Achse ist die Fragmentgröße in nt und auf der y-Achse die Fluoreszenzintensität in FU aufgetragen. In beiden Extraktionsansätzen liegt RNA in sehr guter Qualität vor, was an verschiedenen Faktoren zu erkennen ist. Die Peaks der 16S rRNA und 23S rRNA im Elektropherogramm sind deutlich sichtbar, schmal und nicht breit auseinanderlaufend. Weiterhin ist nach dem Marker-Peak bei etwa 25 nt ein kleiner Peak der 5S rRNA zu sehen. Die 16S/23S rRNA-Peaks sind im Vergleich zum Marker-Peak von hoher Fluoreszenzintensität und die Baseline verläuft sehr gerade. Eine schlechte RNA-Qualität würde aufgrund des Abbaus einen Shift der Baseline in Richtung der kleineren Fragmente verursachen sowie eine Verringerung der Fluoreszenzintensität, da die Interkalation des Farbstoffes gestört würde. Ein weiteres Merkmal für die Beurteilung der RNA-Qualität ist die von Agilent Technologies entwickelte RNA Integrity Number (RIN). Dieses System beziffert die RNA-Qualität von 1 bis 10, wobei 1 dem am meisten degradierten und 10 dem bestmöglichen Profil entspricht. Bei den beiden in Abbildung 19 zu sehenden Extraktionsproben ist die RIN in beiden Fällen mit einem Wert von 9,3 nahezu perfekt. Desweiteren wird das rRNA-Verhältnis 23S/16S ausgegeben, welches bestenfalls zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Ein kleinerer Wert deutet auf abgebautes Probenmaterial hin [Fleige & Pfaffl, 2009: S.128-132]. Laut [Fleige & Pfaffl, 2009: S.131] sind Proben mit einem kleineren 23S/16S-Wert jedoch nicht zwingend von schlechter Qualität, vor allem wenn im Elektropherogramm sonst keine Anzeichen dafür zu erkennen sind.

Neben dem Elektropherogramm, der RIN und dem rRNA-Quotient 23S/16S werden weiterhin ein gelähnliches Bild und die RNA-Konzentration angezeigt.

Zusammenfassend lässt sich für die beiden RNA-Extraktionen festhalten, dass sie in sehr guter Qualität und mit 345 bzw. 339 ng/μl in ausreichender Konzentration vorliegen. Ein Nichtgelingen der RT-PCR kann demnach nicht auf eine schlechte Qualität der Ausgangsproben zurückgeführt werden.

Das auf dem Agarosegel visualisierte Endergebnis von Versuch 4 ist in Abbildung 20 dargestellt.

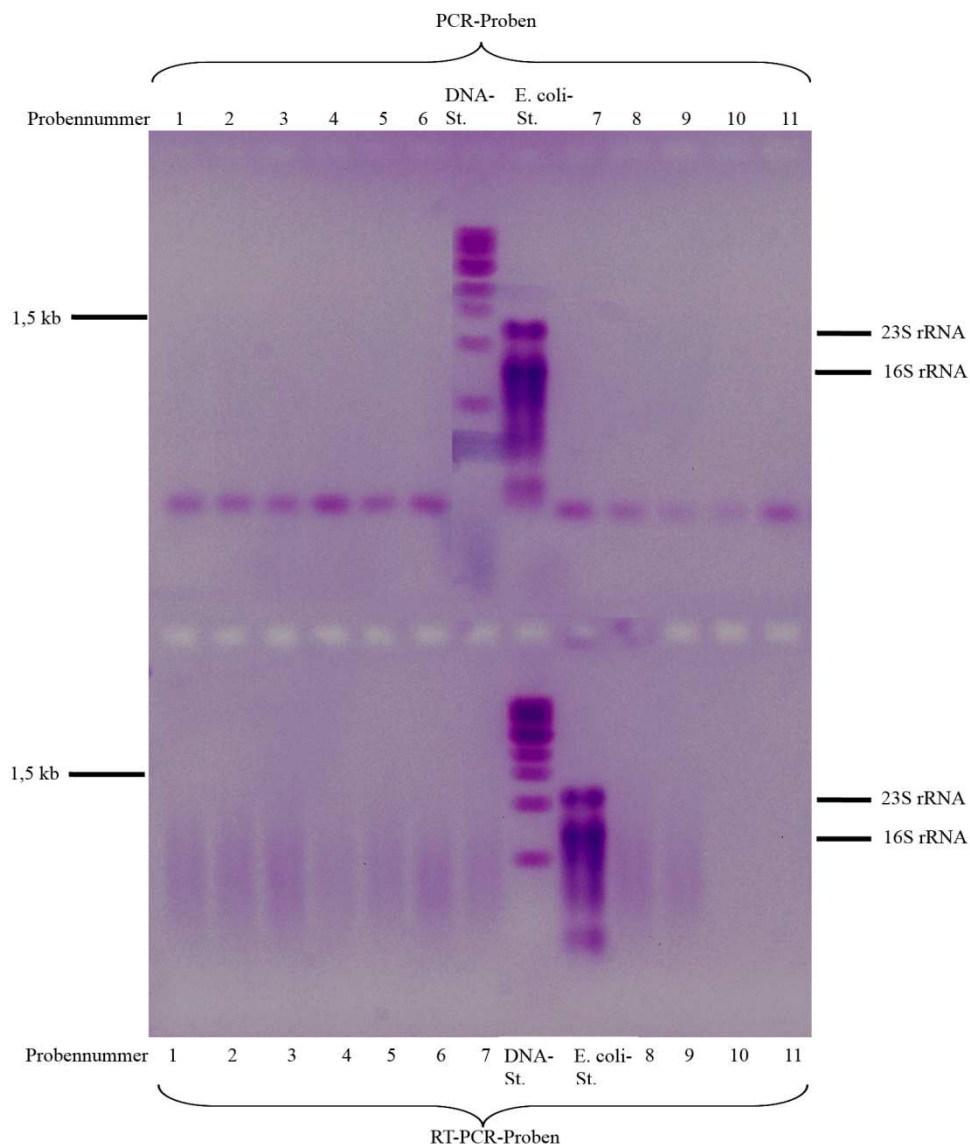


Abbildung 20: Gelbild Versuch 4 - Einsatz einer größeren RNA-Menge in der RT-PCR

Die Proben 1-3 entsprechen RT-PCR-Ansätzen mit Random Primern, bei 4-6 wurden die 16S rRNA-Primer verwendet. Dabei wurden 3 und 6 mit E. coli-Standard durchgeführt. Proben 7-11 sind Kontrollproben. Neben einem E. coli-Standard wurde der 1 kb DNA-Standard aufgetragen. Auch in diesem Versuch hat die RT-PCR nicht funktioniert.

Bei den PCR-Proben sind lediglich Primer-Banden am unteren Rand der Laufspuren zu sehen, bei den RT-PCR-Proben ein leichter Schmier (mit Ausnahme der NT-Ansätze 10,11) verursacht durch die größerer Menge eingesetzter Ausgangsprobe. Erneut sind keinerlei spezifische Banden auf dem Gel zu erkennen, sodass geschlussfolgert werden kann, dass die RT-PCR auch mit der maximal möglichen Menge total RNA von 2 µg pro 20 µl-Reaktion in der cDNA-Synthese unter den angegebenen Bedingungen nicht funktionierte.

5.2.5 Versuch 5: Veränderung des Denaturierungsschrittes in der RT-PCR

In Abbildung 21 ist zu sehen, dass das Variieren der Denaturierungszeit erfolgreich war. Bei allen 15 Proben ist bereits nach der RT-PCR eine deutliche Bande leicht unterhalb der 1,5 kb-Bande des DNA-Standards zu sehen. Die Banden der 15 Proben nach der PCR liegen in etwa auf der Höhe von 1,5 kb. Offensichtlich ist, dass die Bande der 16S rRNA des *E. coli*-Standards, welche eine Länge von circa 1500 bp hat, aufgrund ihrer Struktur sehr viel weiter im Gel wandert, als die in etwa gleichgroße 1,5 kb Bande des DNA-Standards. Da die cDNA neben dem synthetisierten DNA-Erststrang auch noch aus dem RNA-Strang den es umzuschreiben galt besteht, wandert auch sie trotz gleicher Fragmentgröße ein wenig tiefer ins Gel als die zugehörigen DNA-Probe nach der PCR.

Es ist festzuhalten, dass die RT-PCR mit einer Denaturierungstemperatur von 50 °C bei allen gewählten Denaturierungszeiten (60, 45, 30 oder 15 min) gleich gut funktioniert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die vorherige Denaturierung bei 65 °C höchstwahrscheinlich die Reverse Transkriptase zerstört hat und die cDNA-Synthese somit nicht durchgeführt werden konnte. Eine Temperatur von 50 °C hingegen scheint für das Enzym nicht schädlich zu sein, egal ob es dieser Temperatur 15 min oder 1 h ausgesetzt ist. Dass bei den RT-PCR-Proben die ersten vier Banden etwas schwächer als die restlichen erscheinen liegt daran, dass ein Teil der Proben aus dem Gel gelaufen war. Alle 15 RT-PCR-Proben wurden daher zur Kontrolle nochmals auf ein 1,2% Agarosegel aufgetragen und es konnte festgestellt werden, dass die Intensität aller Banden in etwa gleich stark war (nicht abgebildet). Somit kann nicht geschlussfolgert werden, dass die gewählte Denaturierungszeit dieser vier Proben gegenüber den Denaturierungszeiten der anderen Proben einen hemmenden Einfluss auf die RT-PCR hat. Es ist jedoch auch festzustellen, dass die RT-PCR auch genauso gut ohne jegliche Denaturierung (13-15) funktioniert. Da dies für das Enzym Reverse Transkriptase

wahrscheinlich die schonendste Variante ist, wird in allen folgenden RT-PCR-Versuchen auf einen Denaturierungsschritt verzichtet.

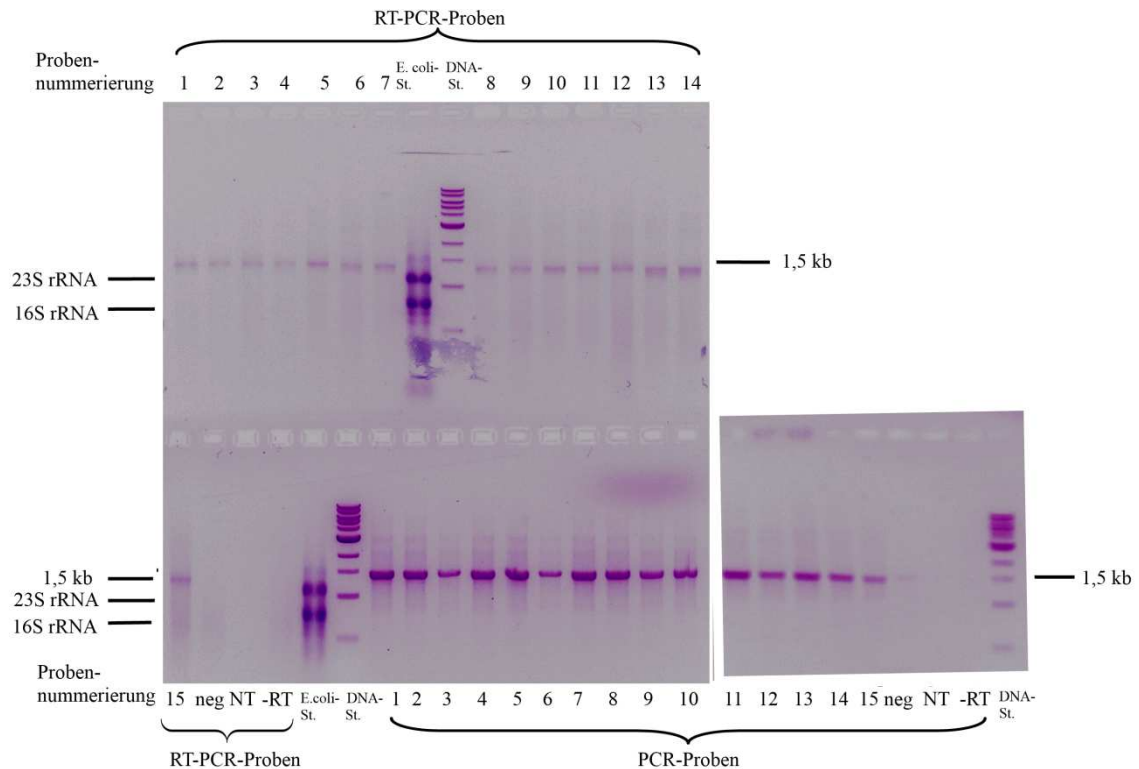


Abbildung 21: Gelbild Versuch 5 – Veränderung des Denaturierungsschrittes in der RT-PCR

In der RT-PCR wurden in diesem Versuch folgende Denaturierungszeiten bei 50 °C verwendet: 1-3: 60 min, 4-6: 45 min, 7-9: 30 min, 10-12: 15 min, 13-15: 0 min. In allen Fällen haben RT-PCR und PCR funktioniert, sodass Banden der ungefähren Größe von 1,5 kb zu erkennen sind. Es wurden Kontrollproben ohne Primer (neg), ohne Template (NT) und ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Neben dem E. coli-Standard wurde der 1,5 kb DNA-Standard aufgetragen.

Sowohl die NT-Kontrolle, als auch die Probe ohne Reverse Transkriptase weisen nach der PCR keine Banden auf, was bedeutet, dass keine Stammlösung verschmutzt war und die Extraktionsprobe vollständig von DNA befreit war. Die Negativkontrolle ohne Primer weist nach der PCR eine zarte Bande in Höhe 1,5 kb auf. Dies könnte auf ein unspezifisches Produkt hindeuten. Da diese Bande jedoch zum ersten Mal auftritt, ist ein Pipettierfehler wahrscheinlicher. Es sollte dennoch weiter beobachtet werden.

Die Banden aller 15 Proben nach der PCR sind sehr viel deutlicher auf dem Gel zu erkennen. Es handelt sich bei dem Amplifikationsprodukt aller Wahrscheinlichkeit nach um ein spezifisches Produkt und die 16S rRNA konnte zunächst in cDNA umgeschrieben und dann mittels PCR vervielfältigt werden. Das Ergebnis dieses Versuches bestätigt auch die Vermutung aus Versuch 2, nämlich dass die PCR von

Banden, womit die Kontamination einer Stammlösung (7-8), DNA-Verunreinigungen (9-10) oder unspezifische Fragmente (11-12) ausgeschlossen werden können. All dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den circa 1,5 kb großen Fragmenten um das Amplifikationsprodukt der 16S rRNA handelt. Um dennoch ganz sicher zu gehen, dass dies tatsächlich der Fall ist, wurde der Restriktionsverdau mit HindIII-HF durchgeführt. Dessen Ergebnis ist in Abbildung 23 zu sehen.

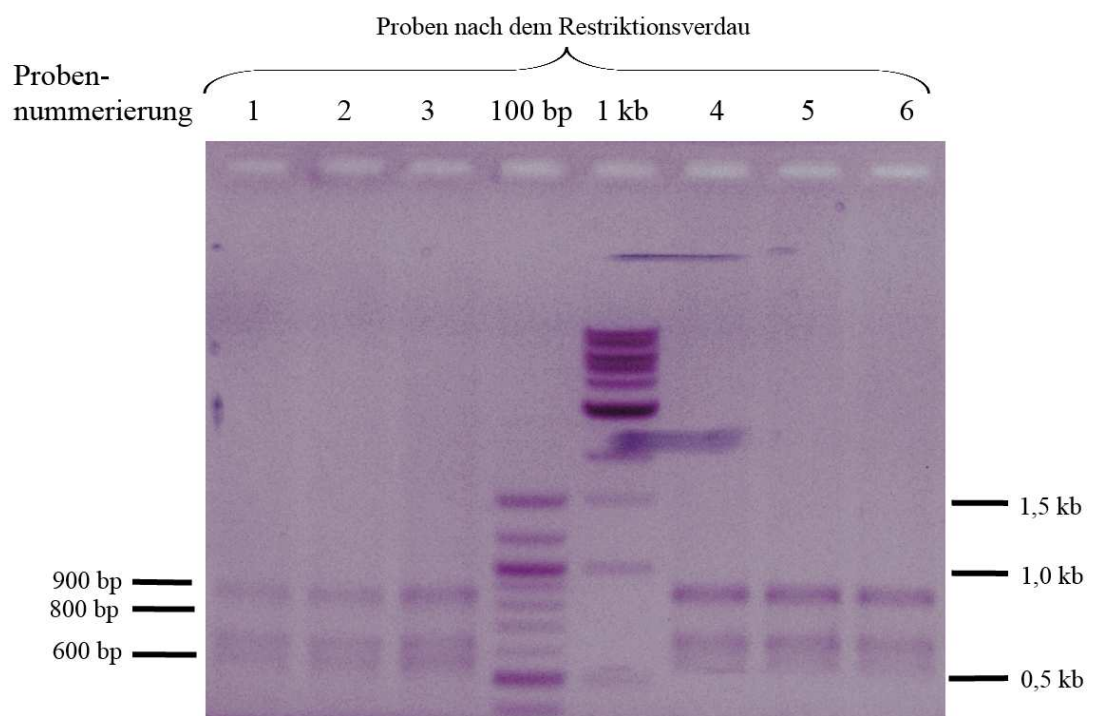


Abbildung 23: Gelbild Versuch 6 - Restriktionsverdau

Im Gel sind Banden eines 6fach Ansatzes vom Restriktionsverdau des 16S rRNA-Amplikons mit HindIII dargestellt. Zu sehen sind jeweils drei Banden von den ungefähren Größen 570, 650 und 860 bp. In der mit 100 bp beschrifteten Spur ist ein 100 bp DNA-Standard aufgetragen, bei der mit 1 kb beschrifteten Spur ein 1 kb DNA-Standard.

Zu sehen sind in allen sechs Ansätzen drei Banden von ungefähr der Größe 570, 650 und 860 bp. Zur Erinnerung: zu erwarten waren Fragmente etwa der Größen 80, 568 und 857 bp (vergleiche 4.3.6). Das heißt zwei Banden (circa 570 und 860 bp) traten wie erwartet auf, jedoch erscheint auf dem Gel eine zusätzliche unerwartete Bande von circa 650 bp. Das Fragment der Größe 80 bp ist auf Grund der sehr geringen Größe aller Wahrscheinlichkeit nach aus dem Gel gelaufen. Vermutlich wäre an dieser Stelle ein höher prozentiges Agarosegel sinnvoll gewesen.

Um eine Erklärung für die drei erschienenen Banden zu finden, wurden alle sieben Sequenzen der Amplifikationsprodukte einzeln und manuell auf die

Restriktionsschnittstellen von HindIII-HF überprüft. HindIII-HF schneidet die 16S rRNA-Konsensussequenz laut NEBcutter an den Stellen 80/84 und 648/652 nt. Das Ergebnis der manuellen Überprüfung der sieben Einzelsequenzen war, dass drei der Sequenzen nur die letzte der beiden Schnittstellen besitzen. Die 16S rRNA-Sequenzen sind sich zwar sehr ähnlich, dennoch kann es leichte Abweichungen geben. So besitzen die drei angesprochenen Sequenzen nicht die AAGCTT-Schnittstelle von HindIII-HF, sondern weichen in einem Nukleotid von dieser ab. Da das Restriktionsenzym seine Schnittsequenz sehr spezifisch schneidet, werden die drei Sequenzen mit der Abweichung in der Schnittstelle an dieser nicht geschnitten. Somit entstehen bei diesen drei Amplifikationsprodukten nur zwei Fragmente etwa der Größe 640 bp und 860 bp. Somit lässt sich die Gelbande von etwa 650 bp erklären. Dass drei codierende 16S rRNA-Sequenzen nur eine anstelle von zwei HindIII-Schnittstellen besitzen und der Fakt, dass die sieben Sequenzen in *E. coli* nicht zu jedem Zeitpunkt gleich stark transkribiert werden erklärt auch die unterschiedliche Intensität der Banden im Gel. Das circa 860 bp große Fragment entsteht in allen sieben Fällen, was verursacht, dass diese Bande im Gel am stärksten erscheint. Die manuelle Überprüfung der sieben 16S rRNA-Amplifikationsprodukte aus dem *E. coli*-Genom auf HindIII-Schnittstellen ist in Anhang 1 dargestellt. Nach diesem Ergebnis des Restriktionsverdaus kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei der nach RT-PCR und PCR erscheinenden etwa 1,5 kb großen Bande tatsächlich um das spezifische Amplifikationsprodukt der 16S rRNA von *E. coli* handelt. Der Versuch 6 wurde (ohne Restriktionsverdau) insgesamt zehn mal wiederholt und lieferte stets ein ähnliches Ergebnis, wie es in Abbildung 22 dargestellt ist. Die Implementierung der RT-PCR-Methode für die 16S rRNA von *E. coli* gilt damit als erfolgreich abgeschlossen.

Zum Schluss des Teilkapitels „Implementierung einer RT-PCR und PCR für die 16S rRNA von *E. coli*“ kann festgehalten werden, dass für die RT-PCR möglichst die maximale Menge an totaler RNA (2 µg/20 µl Reaktion) eingesetzt werden sollte und eine Aufreinigung der Proben nach der RT-PCR sicher von Vorteil für eine gut funktionierende PCR ist. Der entscheidende Schritt zum Erfolg war es jedoch, im RT-PCR-Programm den Denaturierungsschritt von 65 °C wegzulassen.

die Extraktionspufferzugabe fast klar und nur wenig braun gefärbt, während es in der ersten Ausfällung eine tiefbraune Farbe hatte. Im Vergleich zu ihren entsprechenden Proben ohne dieses Verfahren, weisen alle Proben deutlich weniger Schmier auf. Aus allen Proben konnte DNA extrahiert werden, RNA hingegen konnte in ausreichender Menge und akzeptabler Qualität nur mit der Methode TRI extrahiert werden. Die mit Extraktionspuffer behandelten TRI-Proben sind die einzigen Proben, bei denen Banden der 23S und 16S rRNA zu erkennen sind. Nach dem DNase-Verdau sind diese Banden jedoch sehr viel schwächer ausgeprägt. Dennoch ist abschließend zu sagen, dass die RNA-Extraktion für die Biogasprobe am besten mit der TRI-Methode funktioniert und diese daher für die weiteren Versuche verwendet wird.

5.4 Implementierung einer RT-PCR und qPCR für die mcrA-RNA aus einer Biogasprobe

Die Ergebnis-Diagramme der qPCR wurden durch die CFX ManagerTM Software Version 3.0 von Bio-Rad erstellt.

5.4.1 Versuch 8: Amplifizieren der mcrA-RNA mittels qPCR

Sowohl die RT-PCR als auch die qPCR wurden, unter den in 4.5.2 beschriebenen Bedingungen, an RNA aus einer Biogasprobe mit dem mcrA-Primerset durchgeführt. Die qPCR-Datenanalyse lieferte das in Abbildung 25 dargestellte Ergebnis. Die magenta eingefärbten Kurven zeigen das Ergebnis für die Reaktionsansätze A-D. Grün stellen sich die Kontrollproben ohne Reverse Transkriptase dar, orange die NT-Kontrolle. Im Amplifikations-Diagramm wird die Fluoreszenzintensität (RFU) gegen die Zyklenzahl aufgetragen; bei der Schmelzkurvenanalyse der negative erste Differentialquotient von der Veränderung der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur. Die Amplifikations-Daten liefern für die vier Ansätze im Mittelwert einen C_T-Wert von 10,2. Auch die Kontrollproben überschreiten nach circa 26 Zyklen den Threshold. Wenn dies relativ spät passiert, muss es nicht zwingend auf eine Kontamination mit DNA oder der Stammlösung hindeuten. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Reaktion schon länger in der stationären Phase, dann steigt die Gefahr der unspezifischen Produktbildung. Der Kurvenverlauf lässt darauf schließen, dass auf jeden Fall ein Amplifikationsprodukt gebildet wurde. Da SYBR Green I jedoch unspezifisch in sämtliche DNA-Moleküle interkaliert, musste die Spezifität des

Produktes mittels Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese überprüft werden. Optimaler Weise sollte die Schmelzkurve einen einzigen Peak aufweisen und ansonsten flach verlaufen. In diesem Versuch ist ein deutlicher Peak bei 86,5 °C zu verzeichnen, wobei es sich um das spezifische Amplifikationsprodukt handelt. Jedoch verläuft die Kurve sonst nicht flach und weist Wölbungen auf, was die Bildung unspezifischer Produkte vermuten lässt.

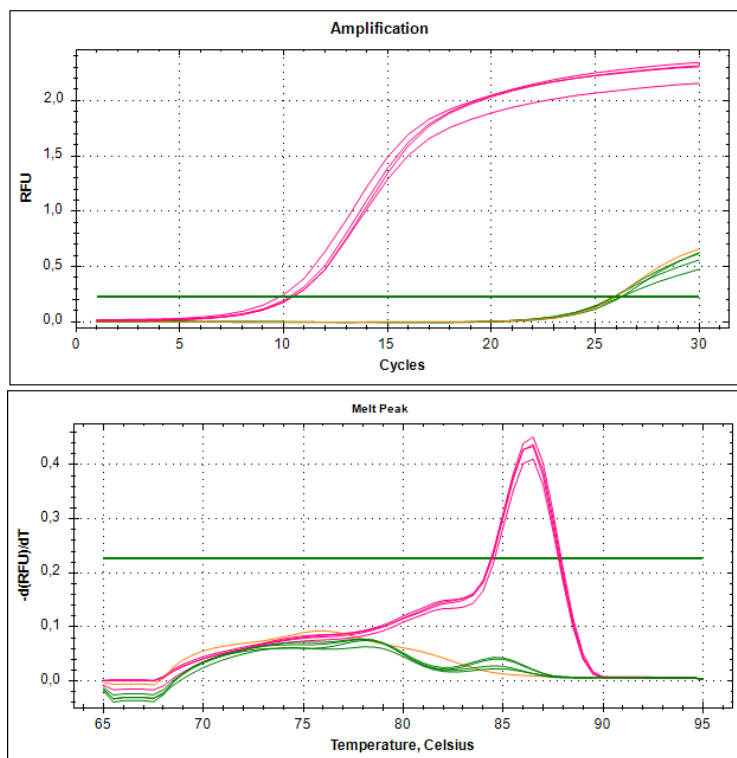


Abbildung 25: qPCR-Ergebnis Versuch 8

Magenta stellen sich die vier Ansätze A-D dar, grün die zugehörigen Kontrollproben ohne Reverse Transkriptase und orange die NT-Kontrolle. Der C_T -Wert liegt in diesem Versuch bei etwa 10,2. Die Schmelzkurve weist neben dem Peak bei 86,5 °C weitere Unebenheiten auf und deutet damit auf unspezifische Produkte hin.

Die Überprüfung der Produktspezifität mittels Gelelektrophorese lieferte das in Abbildung 26 dargestellte Ergebnis. Zu erwarten war mit den verwendeten Primern eine Bande von ungefähr 460-490 bp. Alle vier durchgeführten Reaktionsansätze weisen jedoch neben einer starken Bande bei etwa 500 bp zwei zusätzliche unspezifische Banden bei circa 400 und 280 bp auf, was das Ergebnis der Schmelzkurvenanalyse bestätigt. Die *mcrA*-RNA konnte in cDNA umgeschrieben und anschließend vervielfältigt werden. Jedoch ist die qPCR-Reaktion für das *mcrA*-Amplikon optimierungsbedürftig. Alle Kontrollproben ohne Reverse Transkriptase (-RT) und die

NT-Kontrolle zeigen auf dem Gel keine Banden, womit sich eine Kontamination mit DNA oder der Stammlösungen ausschließen lässt.

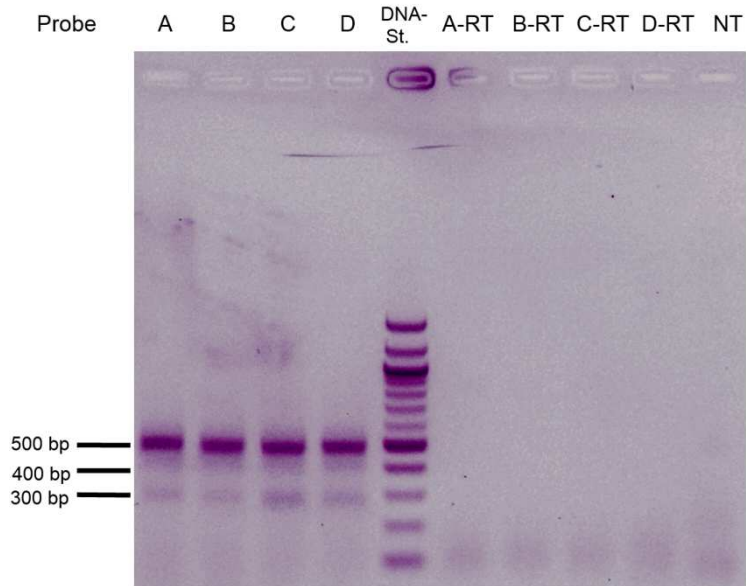


Abbildung 26: Gelbild Versuch 8

Die Spuren A-D zeigen das Ergebnis eines 4fachen qPCR-Ansatzes mit dem *mcrA*-Primerset. Es sind Banden ungefähr der Größe 500, 400 und 280 bp zu erkennen, was auf unspezifische Amplifikationsprodukte schließen lässt. In den mit -RT gekennzeichneten Spuren wurden Kontrollproben ohne Reverse Transkriptase aufgetragen, in der Spur NT die No-Template-Kontrolle. Weiterhin ist der 100 bp DNA-Standard aufgetragen.

5.4.2 Versuch 9: Optimierung der qPCR-Reaktion

Die Auswertung der Gelelektrophorese-Ergebnisse (Abbildung 27) ergibt, dass im ersten Teilversuch mit der Annealingzeit von 45 s kaum Unterschiede zwischen den Versuchen mit Annealingtemperaturen von 51-61 °C zu erkennen sind. Alle Proben weisen neben der stärkeren Bande bei circa 500 bp wieder zwei unspezifische Banden bei etwa 400 und 250 bp auf, die jedoch mit zunehmender Temperatur schwächer werden. Vergleicht man die 61 °C-Bande aus dem ersten Teilversuch mit der 61 °C-Bande aus dem zweiten Teilversuch, wo bis auf die auf 30 s verkürzte Annealingzeit identische Versuchsbedingungen herrschten, so kann man eine deutliche Verbesserung des Ergebnisses feststellen. Es ist lediglich noch eine Bande bei etwa 500 bp zu erkennen, die beiden unspezifischen Banden sind nicht mehr zu sehen. Auch die beiden Spuren der Proben mit 61,8 und 63,2 °C Annealingtemperatur weisen eine deutliche einzelne ungefähr 500 bp große Bande auf. Diese ist auch bei der Probe mit 65,4 °C noch leicht sichtbar, bei allen Proben mit noch höheren Annealingtemperaturen sind keinerlei Banden mehr auf dem Gel zu sehen.

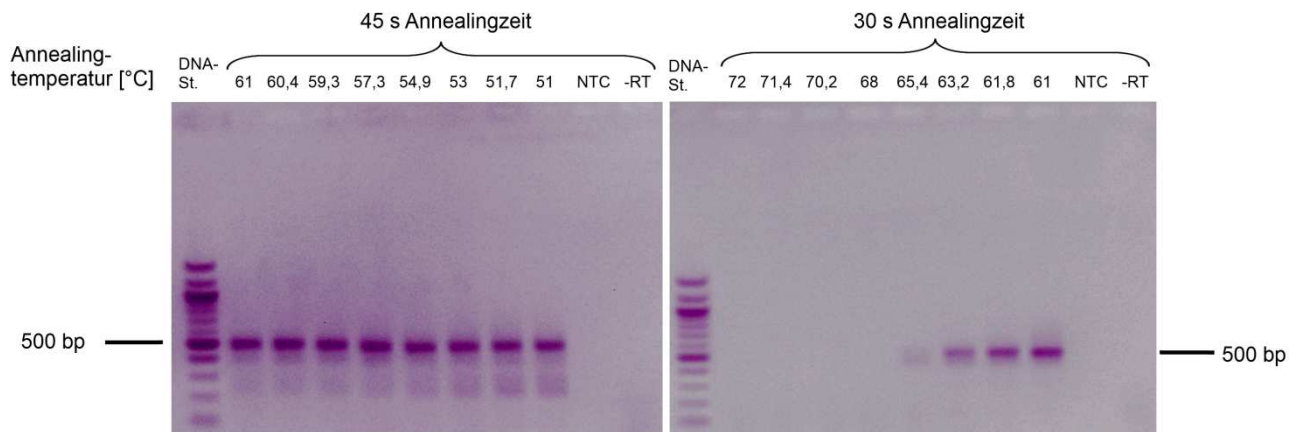


Abbildung 27: Gelbild Versuch 9

Dargestellt ist das Ergebnis zweier qPCR-Versuche mit einem insgesamt Temperaturgradienten von 51-72 °C in der Annealingtemperatur. Die Annealingzeit wurde im zweiten Teilversuch von 45 auf 30 s verkürzt. Sowohl durch die Erhöhung der Temperatur (bis maximal 65,4 °C) als auch durch das Verkürzen der Zeit konnte eine Reduktion oder sogar ein Verschwinden der unspezifischen Banden erzielt werden. Das beste Ergebnis gelang mit 61 °C und 30 s im Annealingschritt.

Auch bei der Datenanalyse der qPCR (Abbildung 28) zeigt sich, dass nur bis zu einer Annealingtemperatur von 65,4 °C ein Amplifikationsprodukt gebildet wird. Bei allen Proben mit höheren Temperaturen (alle grünen Kurven) konnte kein C_T -Wert ermittelt werden. Anhand der Gelbilder ist festzustellen, dass die qPCR mit einer Annealingzeit von 30 s und einer Annealingtemperatur von 61 °C am besten funktionierte, das heißt nur ein einzelnes Amplifikationsprodukt von etwa 500 bp entstand und die Bande ist unter diesen Bedingungen am deutlichsten auf dem Gel sichtbar. Auch die qPCR-Datenanalyse zeigt, dass mit dieser Probe der kleinste C_T -Wert (zwischen 8,97 und 9,97) und die stärkste Fluoreszenzintensität erzielt werden konnte, das heißt am meisten Produkt gebildet wurde. In der Schmelzkurvenanalyse zeigt sich bei dieser Probe ein deutlicher einzelner Peak bei 86 °C und ein sonst flacher Kurvenverlauf. Das Gelbild und die Schmelzkurve zusammen betrachtet lassen auf ein spezifisches Amplifikationsprodukt schließen. Daher wurden die Annealingbedingungen von 30 s und 61 °C für alle folgenden qPCR-Versuche übernommen. Die Kontrollproben ohne Reverse Transkriptase und ohne Template zeigen keine Banden.

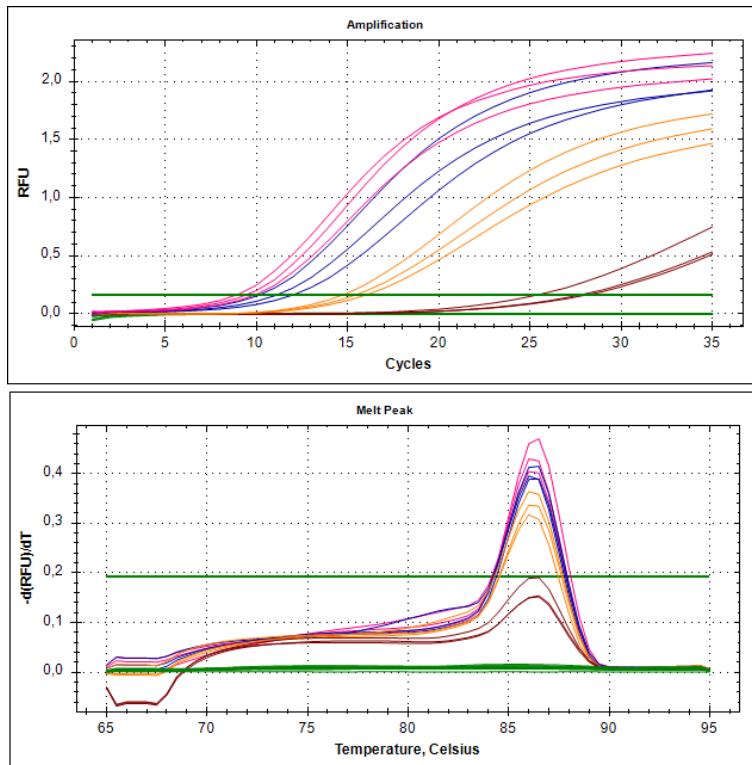


Abbildung 28: Versuch 9 - qPCR-Datenanalyse

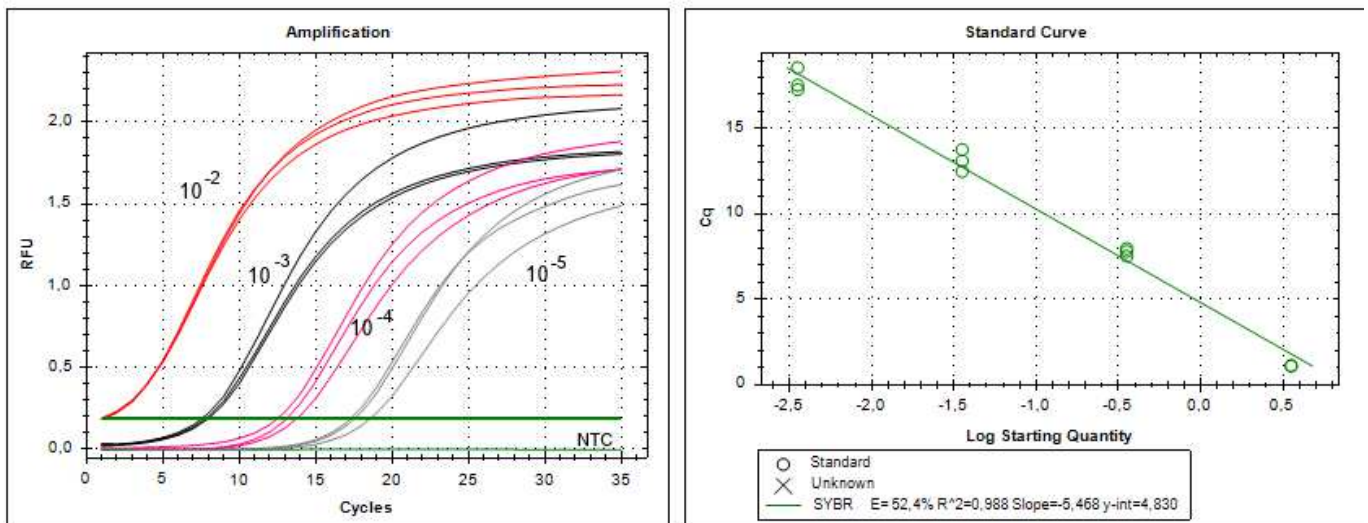
Dargestellt ist das Ergebnis des zweiten Teilversuches mit einer Amplifikationszeit von 30 s. Die magenta, blau, orange und rot eingefärbten Kurven entsprechen der Reihenfolge nach 61, 61,8, 63,2 und 65,4 °C. Alle grünen Kurven unter dem Threshold sind die Proben mit höheren Temperaturen sowie die NT- und ohne Reverse Transkriptase-Kontrollproben.

5.4.3 Versuch 10: Erstellen einer Standardkurve

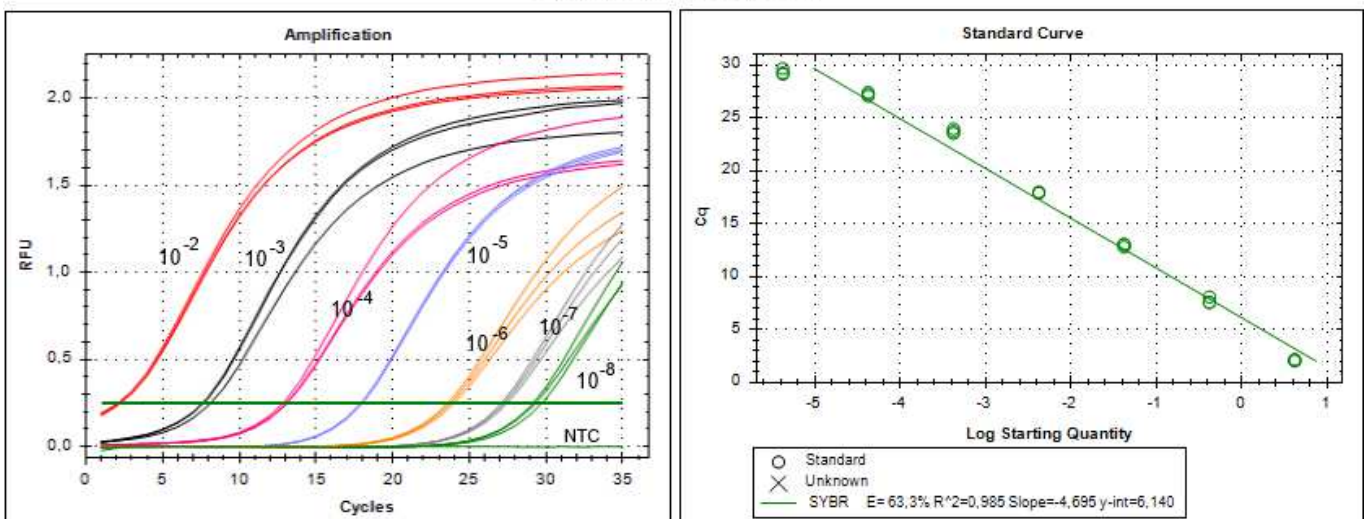
Auch die Standardkurven wurden mit der CFX Manager Software automatisch erstellt, indem der Logarithmus der eingesetzten DNA-Menge gegen den C_T -Wert aufgetragen wird. Für die Erstellung der Standardkurve wurden Verdünnungen einer Probe mit bekannter *mcrA*-Menge [Einheit ng] verwendet. Mit Hilfe der Standardkurve wird die Qualität der durchgeführten qPCR überprüft. Es wird ersichtlich ob die vorherrschenden Bedingungen noch optimierungsbedürftig sind. Weiterhin kann eine Standardkurve zur Quantifizierung eines unbekannten Templates verwendet werden.

Für die erste Standardkurve wurden die Ansätze mit der unverdünnten Probe und der 10^{-1} -Verdünnung manuell aus der Analyse ausgeschlossen, da sie keinen C_T -Wert lieferten. Vermutlich war die eingesetzte Ausgangsmenge zu groß. Die 10^{-6} -Verdünnung wurde aufgrund großer Schwankungen innerhalb des Triplikatansatzes ebenfalls ausgeschlossen. Bei der zweiten erstellten Standardkurve musste lediglich die 10^{-1} -Verdünnung von der Analyse ausgeschlossen werden. Die resultierenden Amplifikations-Diagramme und Standardkurven sind in Abbildung 29 dargestellt.

Standardkurve 1



Standardkurve 2

**Abbildung 29: Versuch 10 – Erstellung zweier Standardkurven**

Für die Erstellung einer Standardkurve wurde von einem *mcrA*-DNA-Template mit bekannter Konzentration einer Verdünnungsreihe hergestellt, diese als Standard definiert und mit ihnen eine Standardkurve erstellt. Dieses Verfahren wurde in zwei Versuchen durchgeführt, sodass die Standardkurven 1 und 2 entstanden. Die zugehörigen Verdünnungen sind an die Amplifikationskurven geschrieben.

Neben der Geradengleichung wird die Amplifikationseffizienz E in % und das Bestimmtheitsmaß R^2 ausgegeben. Die Effizienz E berechnet sich aus dem Anstieg der Standardkurve mit der Formel:

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{Anstieg}}}$$

Um die Effizienz in Prozent zu berechnen wendet man die folgende Formel an:

$$\%E = (E - 1) \times 100\%$$

Bei einer idealen Verdopplung des Amplikons pro Zyklus ergibt sich für die Effizienz ein Wert von 2 und sie sollte in der Praxis zwischen 90 und 105 % liegen.

Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist ein Maß für die Signifikanz des linearen Zusammenhangs und es sollte $R^2 > 0,980$ gelten.

Weiterhin sollten die Amplifikationskurven einer Verdünnungsreihe einen gleichmäßigen Abstand zueinander aufweisen. Hier gilt bei perfekter Verdopplung des Amplikons $2^n = \text{Verdünnungsfaktor}$, wobei n die Zyklenzahl C_T angibt. Somit sollten die C_T -Werte bei einem Verdünnungsfaktor von 10, wie es in diesem Versuch der Fall war, idealerweise einen Abstand von 3,32 aufweisen [URL-3].

Legt man Standardkurve 1 (*blau*: $C_T = -5,468x + 4,83$) und Standardkurve 2 (*schwarz*: $C_T = -4,695x + 6,14$) in einem mit RStudio erstellten Diagramm übereinander (Abbildung 30), kann man feststellen, dass beide Geraden relativ gut übereinstimmen. Mittelt man die beiden Geradengleichungen erhält man die Formel $C_T = -5,082x + 5,485$ (in der Abbildung *rot* dargestellt).

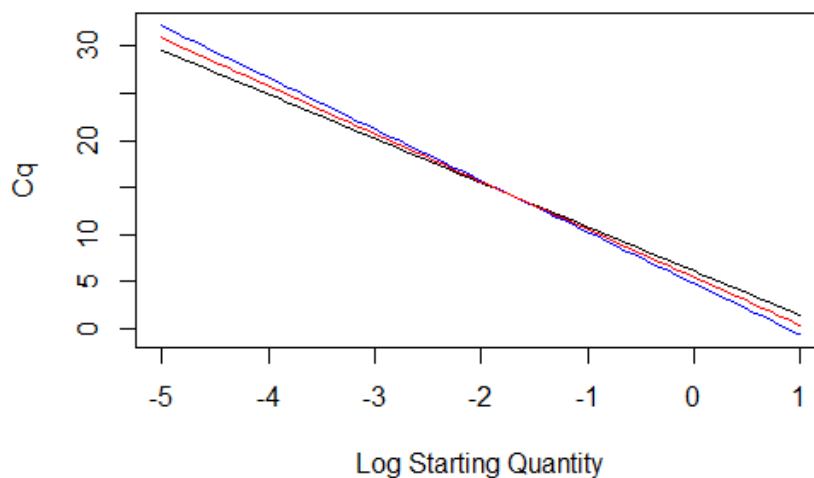


Abbildung 30: Versuch 10 - Die zwei Standardkurven überlagert

Die Standardkurve 1 (*blau*) und Standardkurve 2 (*schwarz*) in einem Diagramm überlagert. Rot dargestellt ist eine berechnete mittlere Standardkurve aus den zwei experimentell ermittelten.

Auch die Bestimmtheitsmaße R^2 liefern mit 0,988 bzw. 0,985 sehr gute Werte. Die Effizienz liegt mit 52,4 bzw. 63,3 % jedoch deutlich unter den optimalen 100 %. Das heißt, pro Zyklus wird das mcrA-Amplikon nicht verdoppelt sondern es erfolgt lediglich ein 1,5 bzw. 1,6-facher Anstieg des Amplifikationsproduktes. Dies kann beispielsweise an schlecht gewählten Primern oder Ähnlichem liegen. Auch der Abstand zwischen den

C_T -Werten ist in beiden Versuchen größer als 3,32 und nicht gleichmäßig, da er mit zunehmender Verdünnung abnimmt. Jedoch sollte man beachten, dass es sich bei der Biogasprobe um eine sehr komplexe Umweltprobe mit vielen verschiedenen Mikroorganismen handelt, aus der zudem die RNA nur in relativ schlechter Qualität extrahiert werden kann. Berücksichtigt man diese Tatsache sowie dass es im vorherigen Versuch bereits gelang unspezifische Banden zu eliminieren, ist das Ergebnis dennoch als positiv zu betrachten. Auch die Überprüfung dieser Proben mittels Gelelektrophorese zeigte erneut bei jeder Probe nur ein spezifisches Amplifikationsprodukt etwa der Größe 480 bis 500 bp (nicht abgebildet).

5.4.4 Versuch 11: Überprüfung der mcrA-Konzentration in unterschiedlich gelagerten Biogasproben

Laut Herstellerangaben soll die Zugabe von RNAProtect die RNA der Probe stabilisieren [URL-17: S.8] Das Gelbild (Abbildung 31) zeigt jedoch, dass sowohl die RNA der reinen Biogasprobe (*Spuren 1, 2*), als auch die der mit RNAProtect gelagerten (*Spuren 3, 4*), stark abgebaut ist. Die Bande der 23S rRNA ist nur sehr schwach erkennbar und alle Proben weisen einen deutlichen Schmier auf, wobei dieser bei den RNAProtect-Proben sogar noch etwas stärker ist. Die Qualität der RNA-Extraktion konnte demnach durch eine Lagerung mit RNAProtect gegenüber der rein gelagerten Biogasprobe nicht verbessert werden. Die qPCR-Proben weisen für alle Ansätze eine starke Bande von ungefähr 500 bp auf. Alle Negativproben zeigten auf dem Gel keine Banden (nicht abgebildet).

Auch im Amplifikationsdiagramm (Abbildung 32) lässt sich kein wirklicher Unterschied zwischen den verschiedenen Proben ohne und mit RNAProtect erkennen. Alle Kurven liegen nah beieinander. Der C_T -Wert der reinen Biogasproben beträgt im Durchschnitt 13,8, der C_T -Wert der mit RNAProtect gelagerten Proben 14,0.

Mit Hilfe der im vorherigen Versuch erstellen Standardkurve lässt sich nun aus den C_T -Werten auch die Quantität des mcrA-Transkriptes ermitteln. Diese berechnet sich aus der Formel

$$Quantity = 10^{\frac{C_T - \text{Schnittpunkt}}{\text{Anstieg}}}.$$

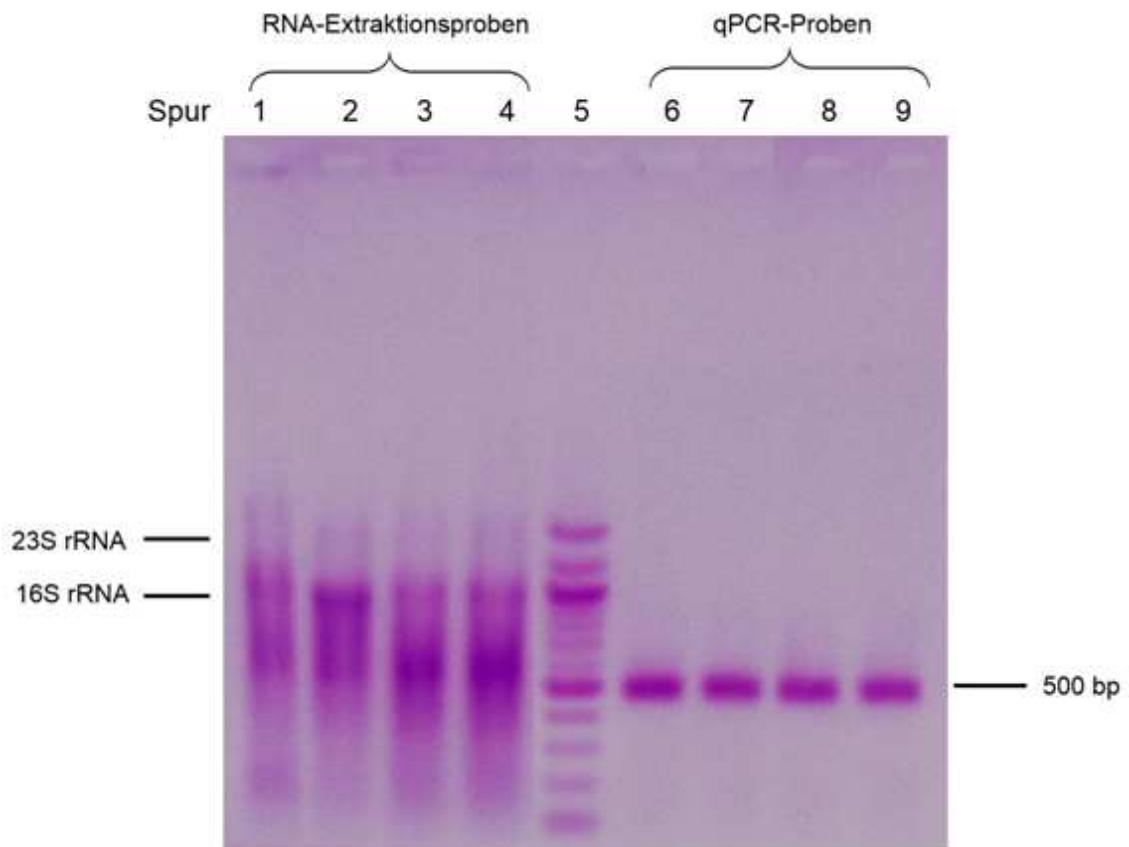


Abbildung 31: Gelbild Versuch 11 – RNA-Qualität zweier unterschiedlich gelagerter Biogasproben
 In den Spuren 1 und 2 sind die RNA-Extraktionsproben der reinen Biogasprobe aufgetragen, in den Spuren 3 und 4 die, die mit RNAlprotect gelagerten. Die Spuren 6-9 enthalten in entsprechender Reihenfolge die zugehörigen qPCR-Proben. In Spur 5 ist der 100 bp DNA-Standard aufgetragen.

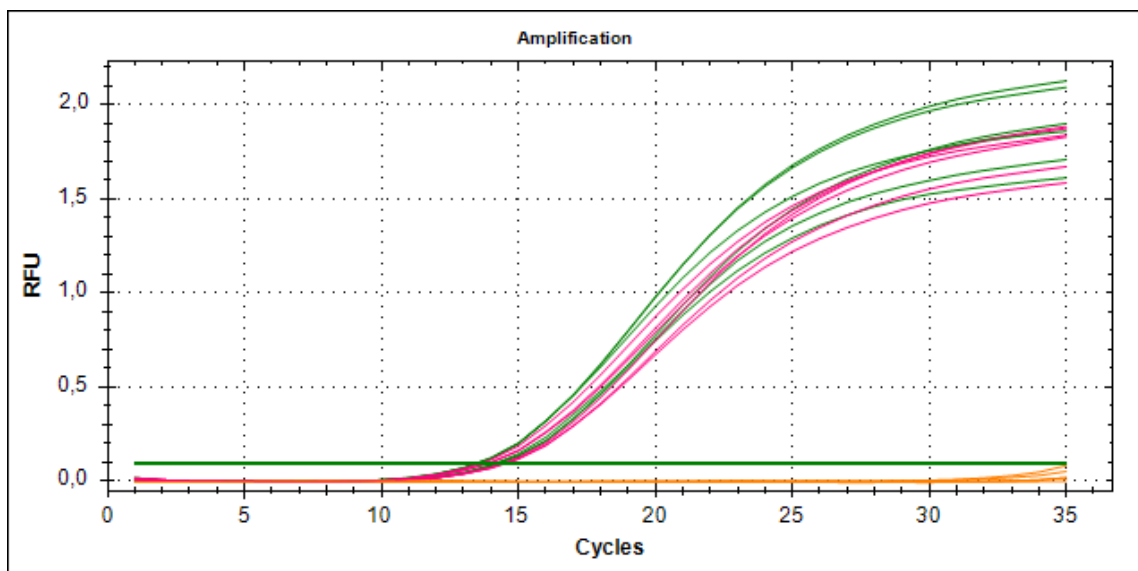


Abbildung 32: Versuch 11 – Amplifikationsdiagramm unterschiedlich gelagerter Biogasproben
 Dargestellt sind die Amplifikationskurven für das *mcrA*-Transkript aus einer reinen (grün) und einer mit RNAlprotect gelagerten (magenta) Biogasprobe. Orange dargestellt sind die Negativkontrollen.

Für einen RT-PCR-Ansatz wurden 2 µg total RNA pro 20 µl-Reaktion eingesetzt. Von diesen Proben wurden 5 µl, das heißt etwa 500 ng total RNA und cDNA, für die qPCR entnommen. Nimmt man nun die gemittelte Standardkurvenfunktion $C_T = -5,082x + 5,485$ aus Versuch 10 zu Hilfe und berechnet mit oben genannter Formel die Quantität, erhält man für die reine Biogasproben einen Wert von 0,02 ng, für die Probe mit RNAProtect 0,0202 ng. Dies entspricht der Menge an mcrA-Transkript, die in 500 ng total RNA enthalten sind. Beide Proben enthalten also nahezu die gleiche Menge an mcrA-rRNA und es konnte kein positiver Effekt des RNAProtect Reagent auf die Qualität oder Quantität der Probe verzeichnet werden. Alle Negativkontrollen weisen auch im Amplifikations-Diagramm kein Amplikon auf.

6 Ausblick

Nach Möglichkeit sollte weiter nach einer Extraktionsmethode gesucht werden, die die Transkripte aller Mikroorganismen gleich stark repräsentiert. Desweiteren muss auch die RNA-Extraktion aus Biogasproben in ihrer Qualität verbessert werden.

Ebenso sollten zukünftig Metatranskriptomanalysen an verschiedenen Fermenterproben aus einer Biogasanlage mit schwankender Prozessstabilität durchgeführt werden, um so Markergene für bestimmte Prozesszustände zu entdecken, welche dann für die Überwachung von Biogasanlagen verwendet werden können.

Die gesamte qPCR-Analytik sollte noch einmal an einer anderen Biogasprobe getestet werden, um festzustellen, ob sich die Methodik übertragen lässt. Es sollte mit einer größeren Datenmenge überprüft werden, inwieweit die Standardkurven übereinstimmen und ob es ratsam ist, diese für jede Biogasprobe oder sogar in jedem Versuchsansatz neu zu erstellen. Weiterhin kann an einer verbesserten Effizienz für die qPCR gearbeitet werden. Die qPCR sollte ebenfalls mit Primern für andere Transkripte etabliert werden.

7 Zusammenfassung

Abschließend ist zu sagen, dass die Effizienz der verschiedenen RNA-Extraktionsmethoden stark vom Zielorganismus abhängt. Sollte hier keine Verbesserung gelingen, muss diese Tatsache bei künftigen Transkriptomanalysen stets berücksichtigt werden.

Es ist nach einigen Misserfolgen erfolgreich gelungen, für die 16S rRNA des Modellorganismus *E. coli* eine RT-PCR-Methode mit anschließender Vervielfältigung durch eine Standard-PCR zu etablieren. Es gelang weiterhin RNA aus einer Biogasprobe in ausreichend guter Qualität zu isolieren. Diese konnte für eine cDNA-Synthese und Amplifikation des *mcrA*-Transkriptes mittels qPCR verwendet werden. Dabei ist es gelungen, dieses Transkript spezifisch zu amplifizieren. Auch wenn die Effizienz dieser Methode nicht optimal ist, betrachte ich das Ergebnis aufgrund der sehr komplexen Biogasprobe als durchaus positiv. Weiterhin gelang die Erstellung einer Standardkurve zur Bestimmung des *mcrA*-Gehaltes der verwendeten Biogasprobe.

Alles in allem lässt sich festhalten, dass das Ziel meiner Arbeit in vollem Umfang erreicht wurde.

Literaturverzeichnis

- Burgmann, H.; Widmer, F.; Sigler, W. V.; Zeyer, J. (2003): *mRNA Extraction and Reverse Transcription-PCR Protocol for Detection of nifH Gene Expression by Azotobacter vinelandii in Soil*. Applied and Environmental Microbiology. Vol.69 (4) : S.1928-1935
- Clark, David P.; Pazdernik, Nanette J. (2009): *Molekulare Biotechnologie : Grundlagen und Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- FNR – Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (2010): *Leitfaden Biogas : Von der Gewinnung zur Nutzung*. - 5. Auflage . s.n. Gülzow
- Farrell, Robert E. (2010): *RNA Methodologies : A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. - 4. Auflage : Elsevier
- Fleige, Simone; Pfaffl, Michael W. (2006): *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. Molecular Aspects of Medicine 27 (2-3) : S. 126-139
- Kleinstaub, Sabine; Nikolausz, Marcell; Sträuber, Heike; Porsch Katharina (2013): *Mikrobielle Gemeinschaften des Biogasprozesses*. Praktikumsskript MSc-Modul Biologie/Biochemie. UFZ-Leipzig
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Higgins, D.G. (2007): *ClustalW and ClustalX version 2.0*. Bioinformatics (Oxford, England) 23 : S.2947-2948
- Luton, Wayne Sharp Riley (2002): *The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill*. Microbiology (148) : S.3521-3530
- Madigan, Michael T.; Martinko, John M. (2009): *Brock Mikrobiologie*. – 11. Auflage : Pearson Studium München
- Mülhardt, Cornel (2009): *Der Experimentator : Molekularbiologie/Genomics*. – 6. Auflage : Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Nettmann, E.; Bergmann, I.; Mundt, K.; Linke, B.; Klocke, M. (2008): *Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcr A analysis*. Journal of Applied Microbiology. 105 (6) : S.1835-1850
- Poretsky, R. S.; Bano, N.; Buchan, A.; LeClerc, G.; Kleikemper, J.; Pickering, M.; Pate, W. M.; Moran, M. A.; Hollibaugh, J. T. (2005): *Analysis of Microbial Gene Transcripts in Environmental Samples*. Applied and Environmental Microbiology. Vol.71 (7) : S.4121-4126

Steinberg, Lisa M. ; Regan, John M. (2008): *Phylogenetic Comparison of the Methanogenic Communities from an Acidic, Oligotrophic Fen and an Anaerobic Digester Treating Municipal Wastewater Sludge*. Applied and Environmental Microbiology. Vol.74 (21) : S. 6663-6671

URL-1 (02/12/2013) BMU – Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit: 2. EEG-Dialogforum „Rolle und Potenzial von Biogas“. URL: <http://www.bmu.de/service/fotos-und-filme/videogalerie/detailansicht/video/2-eeg-dialogforum-rolle-und-potenzial-von-biogas/#jump>

URL-2 (19/11/2013) Nukleinsäuren – Bausteine der DNA. URL: <http://www.chempage.de/theorie/nucleinsaure.htm>

URL-3 (06/12/2013) BioRad: *Real-Time PCR: Applications Guide*. URL: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>

URL-4 (19/11/2013) psdGraphics: *DNA strands, medical icon (PSD)*. URL: <http://www.psdgraphics.com/psd-icons/dna-strands-medical-icon-psd/>

URL-5 (07/02/2013) Epicentre Biotechnologies: *MasterPure™ RNA Purification Kit*. URL: <http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/masterpure-rna-purification-kit.pdf?sfvrsn=4>

URL-6 (11/11/2013) Ambion® by life technologies™: *RNAsecure™ Reagent*. URL: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4386507.pdf>

URL-7 (03/04/2013) Applied Biosystems: *TURBO DNA-free™ Kit : TURBO DNase Treatment and Removal Reagents*. URL: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_055740.pdf

URL-8 (21/12/2013) RStudio: *RStudio ID*. URL: <http://www.rstudio.com/ide/>

URL-9 (1/12/2013) NCBI: *Escherichia coli K12 substr. MG1655 complete genome*. URL: ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/Escherichia_coli_K_12_substr__MG1655_uid57779/NC_000913.frm

URL-10 (30/11/2013) NCBI: *Primer-BLAST: A tool for finding specific primers*. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

URL-11 (21/11/2013) Applied Biosystems: *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*. URL: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042557.pdf

URL-12 (21/11/2013) Qiagen: *RNeasy® Mini Handbook*. – 4. Auflage September 2010. URL: <http://www.qiagen.com/hb/rneasymini>

URL-13 (21/11/2013) Promega: *GoTaq[®] Green Master Mix : Usage Information*. URL: <http://www.promega.de/~media/Files/Resources/Protocols/Product%20Information%20Sheets/G/GoTaq%20Green%20Master%20Mix%20Protocol.pdf>

URL-14 (30/11/2013) Agilent Technologies: *RNA 6000 Nano Kit Guide*. URL: <http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core%20Facilities/Data/R401-core/RNA6000Nanomanual.pdf>

URL-15 (01/12/2013) New England BioLabs: *NEBcutter V2.0*. URL: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

URL-16 (26/11/2013) paint.net: *Paint.NET v3.5.11*. URL: <http://www.getpaint.net/>

URL-17 (04/12/2013) Qiagen: *RNAprotect[®] Bacteria Reagent Handbook*. URL: http://my.jgi.doe.gov/general/protocols/Qiagen_RNAprotect_Bacteria_Reagent_Handbook.pdf

URL-18 (06/12/2013) Epicentre Biotechnologies: *MMLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis Kit*. URL: <http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/mmlv-reverse-transcriptase-1st-strand-cdna-synthesis-kit.pdf?sfvrsn=8>

Wink, Michael (2011): *Molekulare Biotechnologie – Konzepte, Methoden und Anwendungen*. – 2. Auflage : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim

Zhou, J.; Bruns, M.A.; Tiedje, J.M. (1996): *DNA recovery from soils of diverse composition*. Applied and Environmental Microbiology. Vol.62 (2) : S.316-322

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 08. Dezember 2013

Tina Giersch

Anhang 1

Manuelle Überprüfung der sieben möglichen 16S rRNA-Amplifikationsprodukte von *E. coli* auf Schnittstellen des Restriktionsenzymes HindIII-HF

Abgebildet sind die sieben Sequenzen der möglichen 16S rRNA-Amplifikationsprodukte von *E. coli*. Blau hervorgehoben sind die Sequenzen, die **exakt** der Schnittstelle von HindIII-HF entsprechen. Rot hervorgehoben sind die Sequenzen, die um ein Nukleotid von der Schnittsequenz **abweichen** und somit nicht vom Enzym geschnitten werden. Hinter der Bezeichnung *Amplikon_1-7* sind die Fragmentgrößen, die durch eine bzw. zwei Schnittstellen verursacht werden, angegeben

>Amplikon_1: 640 bp, 865 bp

GAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGCAGGCCCTAACACATGCAAGTGAACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGGGTACGGCTCACCTAGGCAGCATCTCTAGCTGGTGTAGAGGATGACCAAGCCACATGGAACCTAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATGCACAATGGGCGCAAGCCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGAGTAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAAGAAGACACCGGCTAACTCCGTGCAGCAGCCGCGTAAATACGAGGGTGAACGCTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAACGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCAGCTTGGAGGTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACGCCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAATGAATGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAGTGAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAGAAATGTGCCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAGGAGACTGTCAGTGAATAACTGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAAGGGCTACACAGCTGTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGTAGTCCGGATTGGAGCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATGCTAGTAACTCGTGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGATACACACGCCCGCTCACACATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGTACTTAACCTTCGGGAGGCGCTTACCCTTTGTGATTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGTAACCGTA

>Amplikon_2: 72 bp, 568 bp, 865 bp

GAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGCAGGCCCTAACACATGCAAGTGAACGGTAACAGGAAGAGCTTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGGGTACGGCTCACCTAGGCAGCATCTCTAGCTGGTGTAGAGGATGACCAAGCCACATGGAACCTAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATGCACAATGGGCGCAAGCCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGAGTAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAAGAAGACACCGGCTAACTCCGTGCAGCAGCCGCGTAAATACGAGGGTGAACGCTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAACGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCAGCTTGGAGGTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACGCCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAATGAATGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAGTGAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAGAAATGTGCCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAGGAGACTGTCAGTGAATAACTGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAAGGGCTACACAGCTGTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGTAGTCCGGATTGGAGCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATGCTAGTAACTCGTGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGATACACACGCCCGCTCACACATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGTACTTAACCTTCGGGAGGCGCTTACCCTTTGTGATTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGTAACCGTA

>Amplikon_3: 72 bp, 568 bp, 865 bp

GAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGCAGGCCCTAACACATGCAAGTGAACGGTAACAGGAAGAGCTTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGGGTACGGCTCACCTAGGCAGCATCTCTAGCTGGTGTAGAGGATGACCAAGCCACATGGAACCTAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATGCACAATGGGCGCAAGCCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGAGTAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAAGAAGACACCGGCTAACTCCGTGCAGCAGCCGCGTAAATACGAGGGTGAACGCTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAACGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCAGCTTGGAGGTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACGCCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAATGAATGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAGTGAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAGAAATGTGCCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAGGAGACTGTCAGTGAATAACTGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAAGGGCTACACAGCTGTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGTAGTCCGGATTGGAGCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATGCTAGTAACTCGTGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGATACACACGCCCGCTCACACATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGTACTTAACCTTCGGGAGGCGCTTACCCTTTGTGATTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGTAACCGTA

>Amplikon_4: 72 bp, 568 bp, 865 bp

GAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGCAGGCCCTAACACATGCAAGTGAACGGTAACAGGAAGAGCTTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGGGTACGGCTCACCTAGGCAGCATCTCTAGCTGGTGTAGAGGATGACCAAGCCACATGGAACCTAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATGCACAATGGGCGCAAGCCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGAGTAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAAGAAGACACCGGCTAACTCCGTGCAGCAGCCGCGTAAATACGAGGGTGAACGCTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAACGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCAGCTTGGAGGTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACGCCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAATGAATGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAGTGAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAGAAATGTGCCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAGGAGACTGTCAGTGAATAACTGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAAGGGCTACACAGCTGTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGTAGTCCGGATTGGAGCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATGCTAGTAACTCGTGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGATACACACGCCCGCTCACACATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGTACTTAACCTTCGGGAGGCGCTTACCCTTTGTGATTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGTAACCGTA

>Amplikon_5: 72 bp, 568 bp, 865 bp

GAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAG**AAGCTT**GCTTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACTGCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGAGTGGGGTACGGCTCACCTAGCGGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCCACTTGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCCTGATGCAGCCATGCGCGGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGAGTAAGTTAATCACTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCAGCAGCCGCGTAACTACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAAGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATCTGATACTGG**C AAGCTT**GAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGACTCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGTACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCAACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCCTCGGGAACCTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGAATAACTGGAGGAAGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGAAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGGCCGTACACCATGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGCGCTTACCACCTTGTGATTACGATGAGGGTGAAGTCGTAACAAAGGTAACCGTA

>Amplikon_6: 861 bp, 644 bp

TACGGTTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAATCACAAGTGGAAGCGCCCTCCCGAAGGTT**AAGCTA**CTACTTCTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGACAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACCTTATGAGGTCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGATGCGCCATTGTAGCAGGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGACCGCTGGCAACAAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTTCGGGACTTAAACCAACATTTCAACAACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACGGTTCCCGAAGGCACATTTCTCATCTCTGAAAACCTCCGTGGATGTCAAGACCAAGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCAATTTGAGTTTAACTTTCGCGGCGTACTCCCGAGGCGGTGCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAAGCCACGCCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCAACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTCGTCAGGGGGCGCCTTCGCCACCGGATTCTCCAGATCTCTACGCAATTCACCGCTACACCTGGAATCTACCCCCCTCTACGAGACT**C AAGCTT**GCCAGTATCAGATGCAAGTTCACAGGTGAGCCCGGGGATTTACATCTGACTTAACAACCGCCTGCGTGGCGTTTACGCCCAAGTAATTCGATTAAAGCTTGCACCTCCGATTACCGGGCTGTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCCTTCTTCGCGGTAACGTCGAATGAGCAAAAGGTATTAACTTTACTCCCTTCTCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCCTTCTCATACACGGGCAATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCGCCACTGTCTGCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAAGTAGGGATCGTGCCTTGGTGAGCGGTTACCCACCAACAAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGCAAGAGGCCGAGGGTCCCTCTTTGGTCTTGCGACGTTATGCTACCGGTTCCAGTAGTTATCCCTCCATCAGGCAGTTCCTCCAGACATTACTACCCGCTCCGCCACTCGTCAGCGAAACAGCAAGCTGTTTCTGTTACCGTTCGACTTGCATGTGTTAGGCTGCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAAACTC

>Amplikon_7: 861 bp, 644 bp

TACGGTTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAATCACAAGTGGAAGCGCCCTCCCGAAGGTT**AAGCTA**CTACTTCTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGACAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACCTTATGAGGTCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGATGCGCCATTGTAGCAGGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGACCGCTGGCAACAAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTTCGGGACTTAAACCAACATTTCAACAACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACGGTTCCCGAAGGCACATTTCTCATCTCTGAAAACCTCCGTGGATGTCAAGACCAAGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCAATTTGAGTTTAACTTTCGCGGCGTACTCCCGAGGCGGTGCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAAGCCACGCCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCAACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTCGTCAGGGGGCGCCTTCGCCACCGGATTCTTCAGATCTCTACGCAATTCACCGCTACACCTGGAATCTACCCCCCTCTACGAGACT**C AAGCTT**GCCAGTATCAGATGCAAGTTCACAGGTGAGCCCGGGGATTTACATCTGACTTAACAACCGCCTGCGTGGCGTTTACGCCCAAGTAATTCGATTAAAGCTTGCACCTCCGATTACCGGGCTGTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCCTTCTTCGCGGTAACGTCGAATGAGCAAAAGGTATTAACTTTACTCCCTTCTCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCCTTCTCATACACGGGCAATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCGCCACTGTCTGCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAAGTAGGGATCGTGCCTTGGTGAGCGGTTACCCACCAACAAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGCAAGAGGCCGAGGGTCCCTCTTTGGTCTTGCGACATTATGCGGTATAGCTACCGGTTCCAGTAGTTATCCCTCCATCAGGCAGTTCCTCCAGACATTACTACCCGCTCCGCCACTCGTCAGCGAAGCAAGCTGCTTCTGTTACCGTTCGACTTGCATGTGTTAGGCTGCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAAACTC

Anhang 2

Veröffentlichung

Im Rahmen meiner Masterarbeit wurde mir gemeinsam mit meinen Betreuern Lucy Stark (corresponding author) und Röbbe Wüschiers eine Veröffentlichung zum Thema „Effizienz der RNA-Extraktion aus ausgewählten Bakterien im Kontext der Biogasproduktion und Metatranskriptomik“ ermöglicht. Die Publikation ist bereits akzeptiert und erscheint demnächst in der Zeitschrift *Anaerobe*. Es folgt an dieser Stelle eine kurze deutsche Zusammenfassung der Veröffentlichung, anschließend ist die Endfassung des Papers angehängt.

Abstract

Um eine optimale Biogas-Ausbeute und Prozessstabilität einer Biogasanlage zu erreichen, ist es essentiell die am anaeroben Abbau beteiligten Mikroorganismen in ihrer Funktionsweise zu verstehen. Würde es gelingen im Transkriptom der Bakterien Marker für bestimmte Fermenterzustände zu finden, kann dies helfen die industrielle Biogasproduktion besser zu überwachen und Prozessstörungen zu vermeiden. Die Fortschritte in der Next-Generation-Sequenzierung sowie die Möglichkeit der bioinformatischen Auswertung der daraus resultierenden Sequenzdaten machen eine Analyse der Transkriptome in großem Maßstab möglich. Um jedoch das Metatranskriptom einer gemischten Bakterienkultur untersuchen zu können, steht die Isolierung hochqualitativer RNA an erster Stelle. Vor allem in gemischten Kulturen aus Umweltproben ist eine unverfälschte Isolation aller Transkripte von entscheidender Bedeutung, um keine falschen Schlussfolgerungen zu ziehen. Im Paper werden fünf verschiedene RNA-Extraktionsmethoden auf neun unterschiedliche Bakterien verschiedener Phyla angewandt. Die Versuche ergaben, dass die Extraktions-Effizienz der verschiedenen Methoden sehr stark vom Zielorganismus abhängt. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass im Metatranskriptom von Umweltproben mit verschiedenen Bakterienspezies, abhängig von der angewandten RNA-Extraktionsmethode einige Mikroorganismen über- oder unterrepräsentiert sind. Diese Tatsache sollte bei der Verwendung von Metatranskriptomdaten stets berücksichtigt werden.



Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anaerobe

Molecular biology, genetics and biotechnology

Efficiency of RNA extraction from selected bacteria in the context of biogas production and metatranscriptomics

Lucy Stark*, Tina Giersch, Röbbbe Wünschiers

Faculty of Mathematics, Natural Sciences and Computer Sciences, University of Applied Sciences Mittweida, Technikumplatz 17, 09648 Mittweida, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2013

Received in revised form

5 September 2013

Accepted 10 September 2013

Available online xxx

Keywords:

Biogas production

Metatranscriptomics

Mixed cultures

Nucleic acid purification

RNA extraction

ABSTRACT

Understanding the microbial population in anaerobic digestion is an essential task to increase efficient substrate use and process stability. The metabolic state, represented e.g. by the transcriptome, of a fermenting system can help to find markers for monitoring industrial biogas production to prevent failures or to model the whole process. Advances in next-generation sequencing make transcriptomes accessible for large-scale analyses. In order to analyze the metatranscriptome of a mixed-species sample, isolation of high-quality RNA is the first step. However, different extraction methods may yield different efficiencies in different species. Especially in mixed-species environmental samples, unbiased isolation of transcripts is important for meaningful conclusions. We applied five different RNA-extraction protocols to nine taxonomic diverse bacterial species. Chosen methods are based on various lysis and extraction principles. We found that the extraction efficiency of different methods depends strongly on the target organism. RNA isolation of gram-positive bacteria was characterized by low yield whilst from gram-negative species higher concentrations can be obtained. Transferring our results to mixed-species investigations, such as metatranscriptomics with biofilms or biogas plants, leads to the conclusion that particular microorganisms might be over- or underrepresented depending on the method applied. Special care must be taken when using such metatranscriptomics data for, e.g. process modeling.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biogas is seen to be one of the key technologies both to reach European Union member states targets for renewable energies in 2020 and to meet their requirements within the European organic waste management directive (EU Directive 2009/28/EG). In 2011, there were 7215 installed biogas plants in Germany, producing 2904 MW (11.63 TOE) of electricity [1]. Germany, currently the biggest biogas producer worldwide, produces ca. 4,000,000 tons of oil equivalent (TOE). This corresponds to roughly 5% of the production goal for 2020 [2]. This trend of a sustainable and environmental friendly energy policy leads not only to an increasing number of biogas production plants worldwide, but directs research to possible process improvements, too. Anaerobic digestion of organic materials is a multi-stage process. Macromolecular structures are broken down to their essential components, converted into intermediates and finally transformed into methane and carbon dioxide. This process is driven by a huge consortium of microorganisms. The produced energy-rich gas can be used directly

for production of electricity or as a substitute for natural gas. Stable operation of anaerobic digesters can become difficult due to the thermodynamics of the metabolic pathways and resulting slow growth rates of involved microorganisms [3,4]. It is economically very important to prevent process failure. Therefore, monitoring chemical key parameters, e.g. concentrations of volatile fatty acids (FOS), total inorganic carbon (TAC), ammonia, or the pH is essential [5–8]. However, these parameters describe the biological state of the fermentation process only partially [9]. Thus, it is more desirable to monitor the microorganisms (e.g. Refs. [10,11]) or the expressed enzymes, i.e. the activity of the microorganisms (e.g. Refs. [12–15]), directly. The latter provides data that can be used to model the overall metabolic process [16].

With the rapid development of next generation sequencing technologies and related bioinformatic analysis software improvements, sequencing of nucleic acids has become easy and affordable. In our research, we are particularly interested in the analysis of the RNA-population of co-occurring bacteria in productive biogas plants by RNA-sequencing (see also Ref. [14] or [15]). This metatranscriptomic approach aims at the identification of the metabolic state of the fermentation process and shall support modeling. Prerequisite to the metatranscriptome description and analysis by RNA-sequencing is the purification of high-quality RNA

* Corresponding author. Tel.: +49 3727 581042.

E-mail address: stark@hs-mittweida.de (L. Stark).

from all organisms contributing to the fermentation process. Previous 16S-rRNA analyses have identified 1930 different microorganisms (48 archaea, 1591 bacteria, and 291 unknowns) in productive biogas fermenters [17]. If one extends the detection methodology to environmental gene tags, these numbers raise tremendously [18]. This huge diversity raises the question if all bacterial species contribute according to their abundance to the final RNA-pool or if the RNA-purification protocol introduces a bias. Here, we present a comparison of the efficiency of five different RNA-extraction methods with nine different bacterial species.

2. Material and methods

2.1. Bacterial growth and harvest

All bacteria were obtained from the DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig/Germany). Overnight batch cultures were grown as suggested (see Table 1) and harvested in their exponential growth phase by centrifugation of 1 ml at $3000 \times g$ for 5 min. Total cell numbers were counted with a Thoma chamber.

2.2. Preparation of reagents and instruments

Each solution was prepared with 0.05% (v/v) DEPC-treated autoclaved water. All chemicals were of analytical grade and used exclusively for work with RNA. Instruments and materials were cleaned with RNase AWAY (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe/Germany).

2.3. Isolation of total RNA

The cell pellets harvested as described in Section 2.1 were subjected to five different RNA-extraction procedures as follows. Final concentrations of total RNA were measured with the Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen/Germany) applying the "Prokaryote Total RNA Nano"-method and default settings. All extractions were performed in 6–12 independent replicates.

2.3.1. TRI: TRI reagent LS and ultrasound (chemical and physical lysis)

The pellet was resuspended in 400 μ l 0.9% (w/v) sodium chloride solution. After addition of 1200 μ l TRI Reagent LS (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Germany) the sample was lysed for 1 min by ultrasound (Bandelin, Berlin/Germany) with an

amplitude at 310 μ m. The ultrasound impacted the sample for 0.5 s followed by a pause of 0.5 s.

2.3.2. BB: bead beating (mechanic lysis)

The pellet was resuspended in 1000 μ l 4 M guanidinium thiocyanate and 25 μ l 20% (w/v) N-lauroylsarcosine. Then the sample was transferred into a 2 ml tube with 100 mg acid-washed glass beads of 212–300 μ m diameter (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Germany). The suspension was homogenized by vortexing for 5 min.

2.3.3. EP: extraction buffer (enzymatic lysis)

The pellet was resuspended in 1000 μ l extraction buffer (see Ref. [19]) plus 12 μ l proteinase K (Life Technologies GmbH, Darmstadt/Germany) and 25 μ l 20% (w/v) SDS by vortexing. Lysis was performed at 65 °C for 15 min and subsequently vortexed for 1 min.

2.3.4. GTC: guanidinium thiocyanate (chemical lysis)

The pellet was resuspended in 1000 μ l 4 M guanidinium thiocyanate plus 25 μ l 20% (w/v) N-Lauroylsarcosine by 10 s vortexing. Lysis was performed at 65 °C for 15 min and subsequently vortexed for 1 min.

2.3.5. MP: MasterPure RNA isolation kit (saline precipitation of proteins)

Extraction was performed using the MasterPure RNA Isolation Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison/Wisconsin/USA) according to manufacturer's instructions. After nucleic acid precipitation DNase digestion was performed (see Section 2.6).

2.4. Partition of proteins

Following total RNA extraction, 800 μ l 24:1 chloroform–isoamyl alcohol (method TRI: 320 μ l chloroform) were added and vortexed for 5 min. Phase separation was achieved by centrifugation (10 min, $14,100 \times g$). The aqueous phase was transferred into a fresh tube. This extraction was repeated as necessary.

2.5. Precipitation of nucleic acids

250 μ l 3 M sodium acetate (pH 5.0) and 1000 μ l isopropyl (–20 °C) were added to the aqueous phase obtained in 2.4. To facilitate the precipitation of the nucleic acids the tube was inverted 40 times. Total nucleic acid was pelletized by centrifugation at $14,100 \times g$ for 15 min. The supernatant was discarded and the pellet washed with 70% (v/v) ethanol twice. Finally, the pellet was air-dried and resuspended in 50 μ l TE-buffer (pH 7.0).

2.6. DNA removal

DNase digestion was performed with the TURBO DNA-free Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt/Germany) following manufacturer's instructions.

2.7. Gel electrophoresis

Agarose gels contained 1.2% (w/v) agarose in $1 \times$ TAE buffer (50 \times contains 2 M Tris, 1 M acetic acid, 50 mM EDTA, pH 8.5; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe/Germany). Prior to loading 10 μ l sample was mixed with 2 μ l 4 M urea, incubated for 10 min at 65 °C and subsequently for 2 min at 0 °C. Finally, 2 μ l $11 \times$ loading buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.6, 0.45% (w/v) Orange G, 60% (v/v) Glycerin, 60 mM EDTA) was added and 10 μ l loaded to gel. Nucleic acid concentrations were measured with a NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Solingen/Germany).

Table 1

Bacterial species that were grown as axenic cultures. Growth media and temperatures are listed. DSM-No = species identifier by the German collection of microorganisms and cell cultures, Braunschweig/Germany; CMC = carboxymethylcellulose.

Microorganism	DSM-No	Medium	Temp.
<i>Cellulomonas uda</i>	20,107	CMC ^a	30 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	10	1 ^b	30 °C
<i>Escherichia coli</i>	498	1 ^b	30 °C
<i>Paracoccus pantotrophus</i>	65	1 ^b	30 °C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6147	1 ^b	30 °C
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. Mobilis	3580	10 ^b	30 °C
<i>Rhizobium radiobacter</i>	30,205	1 ^b	22 °C
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. Plantarum	20,174	11 ^b	30 °C
<i>Ralstonia eutropha</i> HF39	15,444	1 ^b	30 °C

^a 0.5 g carboxymethyl cellulose, 0.1 g NaNO₃, 0.1 g K₂HPO₄, 0.1 g KCl, 0.05 g MgSO₄, 0.05 g yeast extract, 0.1 g glucose, and 100 ml water.

^b Medium according to DSMZ.

2.8. Data analysis and phylogenetic tree

In the box plot in Fig. 1 the median of total RNA concentrations is plotted. The whiskers extend to \pm double standard error. It was generated with the free software environment for statistical computing called R. The bar indicates the median, boxes contain the 2nd and 3rd quartile (Q) of each data set. Plot whiskers extend to maximum Q2 minus 1.5 times the interquartile range (IQR) or Q3 plus 1.5 times IQR.

The phylogenetic tree in Fig. 1 was generated with the MEGA software package version 5.1 [20] from 16S rRNA sequences. For the fully sequenced *Bacillus subtilis* (NC_020507), *Escherichia coli* (NC_000913), *Lactobacillus plantarum* (NC_012984), *Pseudomonas fluorescens* (NC_017911), *Ralstonia eutropha* (NC_008313), *Rhizobium radiobacter* (also *Agrobacterium radiobacter*, NC_011985), and *Zymomonas mobilis* (NC_018145) consensus 16S rRNA sequences were calculated using ClustalW [21] with standard settings. For *Cellulomonas uda* (X83801) and *Paracoccus pantotrophus* (AB098590) 16S rRNA sequences were downloaded from SILVA database version 111 [22]. All sequences were clustered with the neighbor-joining method and validated by 1000 bootstrap replications.

3. Results and discussion

Varying and species-specific yields of an RNA-extraction method applied to a mixed-species sample will impact any subsequent quantitative analysis. Most RNA-extraction kits available work with a lysis solution composed of guanidinium thiocyanate or derivatives of this chaotropic reagent. Due to their protein denaturation properties, these chemicals are strong RNase-inhibitors when used in concentrations of at least 4 M [23]. Alternatively, mechanical and enzymatic principles are used to lyse the samples.

We applied five well established RNA-extraction methods based on different purification principles to 3 gram-positive and 6 gram-negative bacteria (Fig. 1). These species have been chosen because they belong to taxonomic orders found in biogas production [11,17] and cover a relatively broad taxonomic spectrum. The following phyla are included: proteobacteria (*E. coli*, *Paracoccus pantotrophus*, *Pseudomonas fluorescens*, *R. eutropha*, *Rhizobium radiobacter*, and

Zymomonas mobilis), firmicutes (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*), and actinobacteria (*Cellulomonas uda*). Depending on the method applied, extracted concentrations vary significantly between different microorganisms (Fig. 2). The highest RNA yield was obtained from *R. eutropha*. In contrast, it was nearly impossible to lyse *C. uda*. The RNA concentrations of the other microorganisms are in between, but clear distinctions are visible. For most bacteria, one method is significantly superior to all other methods (Figs. 1 and 2). Although the MasterPure RNA isolation kit (MP) performs best in most cases, the yields still vary tremendously. Cell lysis and subsequent RNA extraction with TRI Reagent LS (TRI) give the worst results. The box plot in Fig. 1 shows the true dispersion of the RNA yields for independently replicated extractions. Many extractions are characterized by a wide range of concentration. This is a common observation (see, e.g. Refs. [24–27]) and cannot be explained by varying cellular RNA concentrations, which range between 0.05 and 0.10 pg [28]. This corresponds to a 2-fold difference, while we observe up to 90-fold differences between different bacteria. RNA-extraction from gram-positive bacteria proved to be significantly less efficient than from gram-negative species. It is well known that the bacterial cell wall composition is dependent on both the particular species and its adaption to biotic and abiotic factors. Moreover, there is a significant difference between gram-positive and gram-negative bacteria. The cell wall of gram-positive bacteria consists of thick oligopeptide cross-linked peptidoglycan layer (up to 80 nm), which carries the (glyco-) proteinogenic surface layer and allows survival in harsh environments [29]. In comparison, gram-negative bacteria have a thin oligopeptide cross-linked peptidoglycan layer (up to 8 nm) with the surface layer attached to the outer membrane [29]. The cross-linking oligopeptides are species specific. Consequently, differences in nucleic acid extraction efficiency are to be expected. These, in turn, should have an impact when nucleic acids are extracted from mixed bacterial samples such as biofilms or, in our case, the content of anaerobic digesters.

A common feature of all selected methods is the purification of total nucleic acids. Thus, concurrently with RNA, DNA is isolated and needs to be DNase-digested in a separate step. Remaining DNA contaminations were checked by gel electrophoresis (not shown). Complete digestion of contaminating DNA also ensures correct RNA concentration measurements. Remaining small DNA fragments

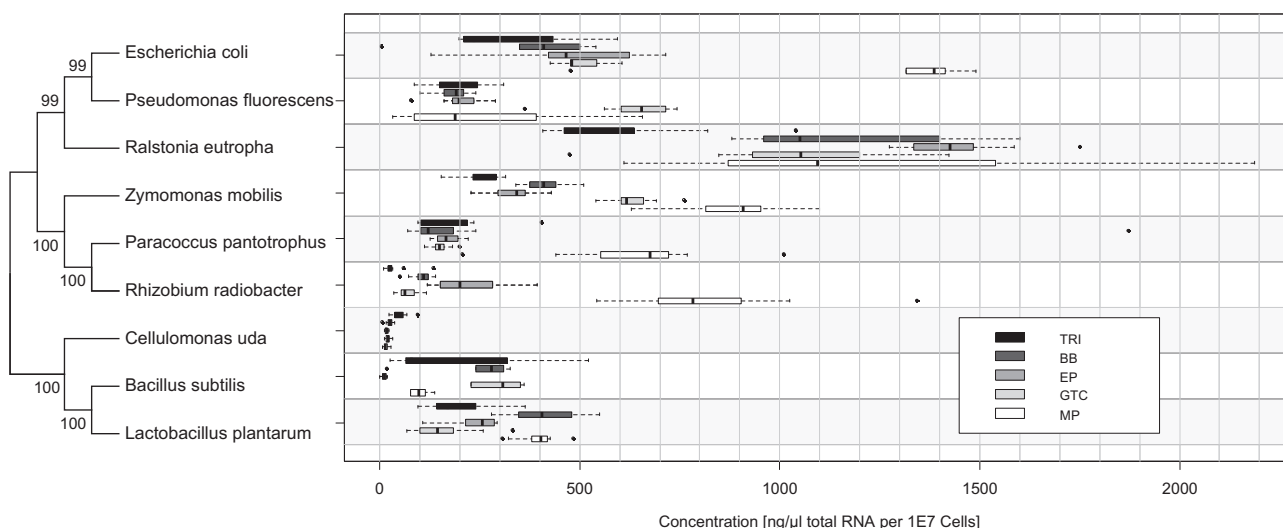


Fig. 1. Bacterial species are ordered according to their 16S rRNA relationship as analyzed by the neighbor-joining method. Branching points are labeled with percentage concordance for 1000 bootstrap repetitions. RNA yield for 6–12 independent replicates (see Fig. 2) is plotted for each species and each method, respectively. Boxes contain the 2nd and 3rd quartiles (Q) of each data set, separated by median. Whiskers extend to the minimum and maximum of the distribution, respectively. If the maxima extend to more than 1.5-times the interquartile range, they are plotted as individual dots. One outlier for *R. eutropha* (method MP) with a value of 3400 has been omitted. Method shortcuts: TRI = TRI reagent LS and ultrasonic disintegration; BB = bead beating; EP = extraction buffer and proteinase K; GTC = guanidinium thiocyanate; MP = MasterPure.

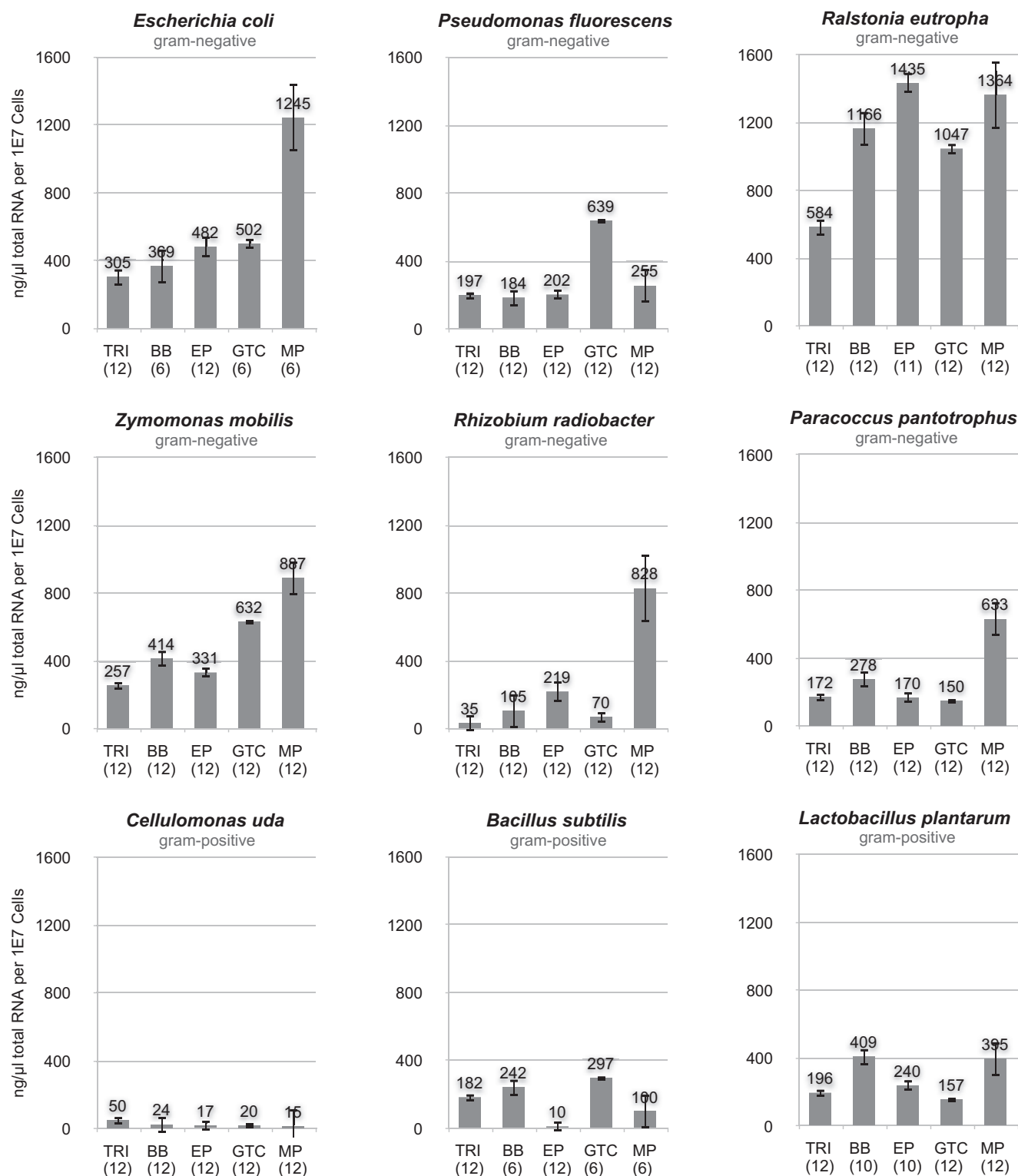


Fig. 2. Mean RNA yield from all five extraction methods applied to nine bacteria is shown. Data are the same as for Fig. 1. The whiskers extend to \pm double standard error. Sample sizes are shown in parenthesis at the abscissa. Method shortcuts are the same as in Fig. 1.

may increase the apparent RNA concentration. Fig. 3 shows all samples prior to DNase treatment. In analogy to the results of varying RNA concentrations, DNA-extraction yields vary, too. As can be elucidated from the agarose gel in Fig. 3, RNA band intensities do not correlate with the corresponding DNA band intensities (at the top of each lane) for different methods and different organisms.

The overall bad results obtained with method TRI may be due because it is especially designed for pure RNA extraction without contaminating DNA (Fig. 3). Furthermore, heat generation during ultrasonic disintegration may add to this bad performance of TRI. Probably, better results can be obtained by adding a cooling step.

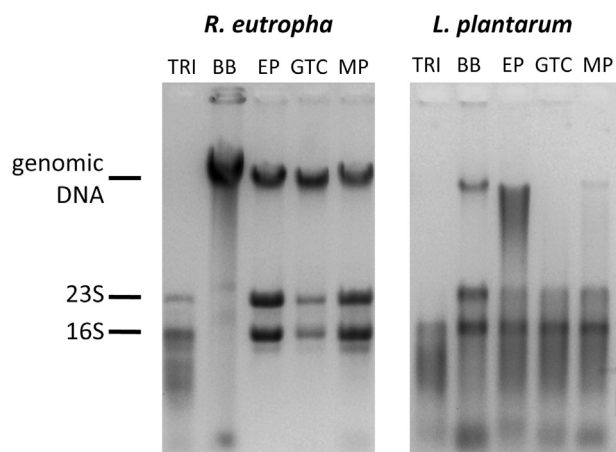


Fig. 3. Agarose gel images of *L. plantarum* and *R. eutropha* nucleic acid extraction prior to DNase treatment. Samples run on two different gels. Each well was loaded with 3.5 µg total nucleic acid. Method shortcuts are the same as in Fig. 1.

Differences in cell wall composition may also be the reason for inconsistent values of isolated DNA between the investigated microorganisms and methods. RNA degradation through RNases can be ruled-out. An exception is method EP, which employs proteinase K that has been shown to inactivate RNases inefficiently [30]. It is unknown why some methods allow RNA but no DNA extraction (*B. subtilis* and *L. plantarum*, Fig. 3). Future research may be needed to answer this question.

All five methods are cost efficient, fast and scaleable. The TRI method is most intricate and holds the largest risk of cross-contamination when handling the sonotrode and transcript fragmentation caused by ultrasonic disintegration. The biggest challenge with an organic extraction step (TRI, BB, EP, GTC) is the proper location of the interphase. Here, the risk of RNase contamination from the interphase is high. The MP method proved most user-friendly and the risk of RNase carryover is minimized because cellular proteins are separated by a salt-precipitation step yielding solid pellet.

A statement if the differing concentrations are caused by varying lysis efficiency of all present microorganisms or just some of them cannot be made. Incomplete capturing of all bacterial transcripts in a sample may cause systematical bias. Important information from difficult-to-lyse microorganisms may be lost in background noise. Especially in anaerobic digestion plants a correlation between biochemical, physical or chemical parameter is difficult [8]. If quantitative data is required, e.g. the abundance of transcripts in a metatranscriptome analysis, different mRNA extraction yields should have a severe impact on the result and, e.g. on subsequent process modeling. Extraction and subsequent sequencing of a metatranscriptome from a mixed-organism sample will not represent transcripts quantities as in the original sample. The bias introduced depends strongly on the RNA-extraction method applied. If transcripts can be attributed to specific organisms, there may be a chance to correct for the transcript purification efficiency.

4. Conclusion

In environmental samples many different microorganisms from a wide range of phyla occur. We show that not all microorganisms can be lysed with the same success. Yielded RNA concentrations and integrity differ also between the used methods. The observed concentration differences cannot be explained by cellular RNA content alone. For all gram-positive bacteria included in this study, RNA-extraction efficiency is significantly impaired. Furthermore, extraction yields vary significantly between methods and

organisms. Thus, no RNA-extraction method can be preferred over another. This finding has severe impact on the usability of metatranscriptomic data. Extraction and subsequent sequencing of a metatranscriptome from a mixed-organism sample will not represent transcripts quantities as in the original sample. The bias introduced depends strongly on the RNA-extraction method applied. If transcripts can be attributed to specific organisms, there may be a chance to correct for the transcript purification efficiency. However, observed differences due to different metabolic and growth states may be balanced by standard normalization procedures based on 16S RNA or housekeeping-gene transcripts [31]. As a next step we are currently investigate such effects.

Based on the results of this study, results of metatranscriptomic and metagenomic studies should be handled with care. We are just beginning to understand complex microbial ecosystems. If only a (probably distorted) fraction of all community members is studied, important information may be lost or seen in a wrong context. It is important to note that our experiments are based on axenic (pure) cultures. Further experimentation on mixed-species samples is required.

Acknowledgments

This work was kindly supported by an SAB-funded (Central Development Agency of the Free State of Saxony, Germany) PhD fellowship to LS and funding from the SMWK (State Ministry for Higher Education, Research and the Arts, Free State of Saxony, Germany) to RW. The authors like to express their gratitude to Michael Wolf for support in RNA extractions.

References

- [1] F.N.R. e V. Biogas. 8th ed. Gülzow-Prützen: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR); 2012.
- [2] Böttcher J. Management von Biogas-Projekten. 1st ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 2013.
- [3] Märkl H, Friedmann H. Biogasproduktion. In: Antranikian G, editor. Angewandte Mikrobiologie. Heidelberg: Springer-Verlag; 2006. p. 460–87.
- [4] Ferrer I, Vázquez F, Font X. Long term operation of a thermophilic anaerobic reactor: process stability and efficiency at decreasing sludge retention time. *Bioresour Technol* 2010;101:2972–80.
- [5] Ahning BK, Sandberg M, Angelidaki I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995;43: 559–65.
- [6] Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresour Technol* 2008;99:4044–64.
- [7] Nielsen HB, Angelidaki I. Strategies for optimizing recovery of the biogas process following ammonia inhibition. *Bioresour Technol* 2008;99:7995–8001.
- [8] Illmer P, Schwarzenauer T, Malin C, Wagner AO, Müller LM, Gstraunthaler G. Process parameters within a 750,000 litre anaerobic digester during a year of disturbed fermenter performance. *Waste Manage* 2009;29:1838–43.
- [9] Nettmann E, Bergmann I, Klocke M. Methanogene Archaea in landwirtschaftlichen Biogasanlagen, in Bayerische Landesanstalt für Landtechnik (LfL). In: Erding (Germany), editor. Internationale Wissenschaftstagung biogas science 2009, LfL-Schriftenreihe band 2009. p. 303–18.
- [10] Klocke M, Mähnert P, Mundt K, Souidi K, Linke B. Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Syst Appl Microbiol* 2007;30: 139–51.
- [11] Nelson MC, Morrison M, Yu Z. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresour Technol* 2011;102:3730–9.
- [12] Poretsky RS, Bano N, Buchan A, LeClerc G, Kleikemper J, Pickering M, et al. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:4121–6.
- [13] McGrath KC, Thomas-Hall SR, Cheng CT, Leo L, Alexa A, Schmidt S, et al. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities. *J Microbiol Methods* 2008;75:172–6.
- [14] Yu K, Zhang T. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of microbial community structure and gene expression of activated sludge. *PLoS ONE* 2012;7:e38183.
- [15] Zakrzewski M, Goesmann A, Jaenicke S, Jünemann S, Eikmeyer F, Szczepanowski R, et al. Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. *J Biotechnol* 2012;158:248–58.

- [16] Gilbert JA, Field D, Huang Y, Edwards R, Li W, Gilna P, et al. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. *PLoS ONE* 2008;3:e3042.
- [17] Krause L, Diaz N, Edwards R, Gartemann K, Krömeke H, Neuweiger H, et al. Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J Biotechnol* 2008;136:91–101.
- [18] Jaenicke S, Ander C, Bekel T, Bisdorf R, Dröge M, Gartemann K-H, et al. Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PLoS ONE* 2011;6:e14519.
- [19] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:316–22.
- [20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731–9.
- [21] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23:2947–8.
- [22] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D590–6.
- [23] Farrell RE. RNA methodologies: laboratory guide for isolation and characterization. 4th ed. Amsterdam: Academic Press; 2010.
- [24] Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006;27:126–39.
- [25] Phongsisay V, Perera VN, Fry BN. Evaluation of eight RNA isolation methods for transcriptional analysis in *Campylobacter jejuni*. *J Microbiol Methods* 2007;68:427–9.
- [26] Jahn CE, Charkowski AO, Willis DK. Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *J Microbiol Methods* 2008;75:318–24.
- [27] Bergmann I, Mundt K, Sontag M, Baumstark I, Nettmann E, Klocke M. Influence of DNA isolation on Q-PCR-based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. *Syst Appl Microbiol* 2010;33:78–84.
- [28] Brown TA. Genomes 3. 3rd ed. New York: Garland Science; 2007.
- [29] Madigan MT, Martinko JM, Clark DP, Stahl DA. Brock – biology of microorganisms. 12th ed. Boston: Benjamin-Cummings Publishing Company; 2010.
- [30] Hurt RA, Qiu X, Wu L, Roh Y, Palumbo AV, Tiedje JM, et al. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4495–503.
- [31] Rodríguez-Ezpeleta N, Rodríguez-Ezpeleta N, Hackenberg MR, Aransay AM. Bioinformatics for high throughput sequencing. 1st ed. New York: Springer Publisher; 2012.